

**RITA DE CÁSSIA MELO VILHENA DE ANDRADE FONSECA  
DA SILVA**

**EFEITO VASORRELAXANTE E HIPOTENSIVO DE  
EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DA PLANTA  
*Scutia buxifolia*: PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO  
E DE CANAIS DE POTÁSSIO**

**Orientador: Prof. Dr. José  
Eduardo da Silva-Santos  
Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>  
Cândida L. Kassuya**

**CURITIBA  
2011**

**RITA DE CÁSSIA MELO VILHENA DE ANDRADE FONSECA  
DA SILVA**

**EFEITO VASORRELAXANTE E HIPOTENSIVO DE  
EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DA PLANTA  
*Scutia buxifolia*: PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO  
E DE CANAIS DE POTÁSSIO**

Dissertação apresentada ao curso de  
Pós-Graduação em Farmacologia do  
Setor de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal do Paraná,  
como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Mestre em  
Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo da  
Silva-Santos.

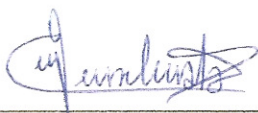
Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cândida L.  
Kassuya.

**CURITIBA**

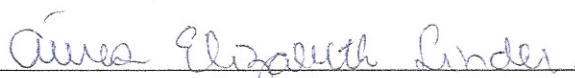
**2011**

**ATA DO JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

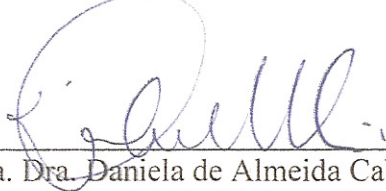
1           Ao décimo quinto dia do mês de julho do ano de dois mil e onze, às nove horas, no  
2           Auditório do Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade  
3           Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado de  
4           autoria da pós-graduanda em Farmacologia **RITA DE CASSIA MELO VILHENA DE**  
5           **ANDRADE FONSECA DA SILVA**, intitulada: "EFEITO VASORRELAXANTE E  
6           HIPOTENSIVO DE EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DA PLANTA *Scutia buxifolia*:  
7           PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO E DE CANAIS DE POTÁSSIO", sob orientação do  
8           Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos e composta pelos professores: Profa. Dra. Aurea  
9           Elizabeth Linder (UFSC) e Profa. Dra. Daniela de Almeida Cabrini (UFPR). A Banca  
10          Examinadora iniciou os trabalhos. A candidata teve quarenta e cinco minutos para expor  
11          oralmente seu trabalho, sendo em seguida argüida durante quinze minutos por cada um dos  
12          membros da Banca, e tendo trinta minutos para responder a cada uma das arguições. No  
13          final a Comissão Examinadora emitiu o seguinte parecer: APROVADO. De  
14          acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-  
15          graduanda foi aprovada. Para a publicação o trabalho deverá sofrer as modificações  
16          sugeridas, que serão conferidas pelo seu orientador. Nada mais havendo a tratar, o  
17          Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a presente ata, que será assinada  
18          pelo Presidente e pelos demais Membros da Banca Examinadora, em Curitiba, 15 de julho  
19          de 2011.  
20



Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos (Orientador - UFSC)



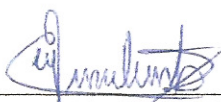
Profa. Dra. Aurea Elizabeth Linder (UFSC)



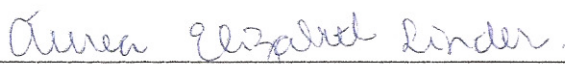
Profa. Dra. Daniela de Almeida Cabrini (UFPR)

## PARECER

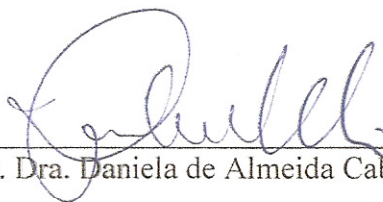
A Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado "EFEITO VASORRELAXANTE E HIPOTENSIVO DE EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DA PLANTA *Scutia buxifolia*: PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO E DE CANAIS DE POTÁSSIO", de autoria da pós-graduanda **RITA DE CASSIA MELO VILHENA DE ANDRADE FONSECA DA SILVA**, sob orientação Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos e composta pelos professores: Profa. Dra. Aurea Elizabeth Linder (UFSC) e Profa. Dra. Daniela de Almeida Cabrini (UFPR). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi APROVADA. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pelo seu orientador. Em Curitiba, 15 de julho de 2011.



Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos (Orientador - UFSC)



Profa. Dra. Aurea Elizabeth Linder (UFSC)



Profa. Dra. Daniela de Almeida Cabrini (UFPR)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por iluminar e abençoar a meu caminho;

Ao meu querido pai Germano pelo amor e pelo exemplo de coragem, determinação e respeito para com os outros;

Ao meu esposo Ives, e aos meus filhos, Pedro Henrique, André e Lucas pela paciência, incentivo e compreensão no dia a dia;

A minha mãe Sueli e minhas irmãs, Regina Fátima, Sueli e Mônica, pelo incentivo, carinho e amor;

A Prof<sup>a</sup> Maria Consuelo pelo exemplo de dedicação à farmacologia;

A Prof<sup>a</sup> Cândida pela amizade e incentivo científico;

Ao Prof. José Eduardo pelos ensinamentos transmitidos que contribuíram para a execução e conclusão deste trabalho;

A Sandra Crestani e Priscila de Souza pela amizade, parceria e sugestões dadas em todas as etapas deste trabalho;

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia e biotério pela amizade e apoio técnico prestado.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>11</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>13</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>15</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1 Hipertensão Arterial.....	20
1.1.1 Controle fisiológico da pressão arterial .....	23
1.1.2 O endotélio vascular.....	27
1.1.3 Participação do óxido nítrico no relaxamento dependente de endotélio .....	28
1.1.4 Prostaciclina.....	30
1.1.5 Canais de potássio.....	30
1.1.6 O cálcio no músculo liso vascular .....	33
1.2 <i>Scutia buxifolia</i> .....	35
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
2.1 Objetivo geral .....	37
2.2 Objetivos específicos.....	37
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
2.3 Material botânico .....	38
2.4 Preparo do extrato bruto das cascas e das folhas e frações da <i>Scutia buxifolia</i> 38	
2.5 Material biológico.....	39
2.6 Drogas, sais e reagentes.....	40
2.7 Procedimento para o isolamento de aorta torácica de rato .....	40
2.8 Metodologia para o registro direto da pressão arterial em ratos anestesiados	41
2.9 Avaliação da atividade diurética aguda (dose única).....	42
2.10 Protocolos experimentais. ....	42
2.10.1 Caracterização do efeito vasodilatador dos extratos bruto das cascas e das folhas e frações de <i>S. buxifolia</i> , <i>in vitro</i> . ....	43
2.10.2 Avaliação do envolvimento de receptores, muscarínicos (tipo M <sub>3</sub> ), bradicininérgicos (tipo B <sub>2</sub> ) e histaminérgicos (tipo H <sub>1</sub> ) nos efeitos vasorrelaxantes da fração butanólica da casca da <i>S. buxifolia</i> . ....	43

2.10.3 Investigação do envolvimento do óxido nítrico, guanilato ciclase e da prostaciclina, no efeito vasorrelaxante da fração butanólica das cascas da <i>S. buxifolia</i> .....	44
2.10.4 Avaliação do efeito da fração butanólica das cascas da <i>S. buxifolia</i> sobre a contração induzida pela fenilefrina .....	44
2.10.5 Avaliação do envolvimento do cálcio extra e intracelular nos efeitos dilatadores da fração butanólica de <i>S. buxifolia</i> na aorta de ratos .....	44
2.10.6 Avaliação do envolvimento dos canais de K <sup>+</sup> no efeito vasorrelaxante da fração butanólica das cascas da <i>S. buxifolia in vitro</i> .....	45
2.10.7 Avaliação da atividade diurética aguda (dose única) em ratos normotensos.	46
2.10.8 Investigação do efeito da administração oral da fração butanólica da <i>S. buxifolia</i> na pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos .....	46
2.10.9 Avaliação do efeito da fração butanólica sobre a PAM de ratos durante a infusão contínua de fenilefrina.....	46
2.10.10 Efeito da fração butanólica na PAM de ratos durante a infusão contínua de L-NAME.....	47
2.10.11 Avaliação da participação da enzima guanilato ciclase solúvel sobre a ação da fração butanólica na PAM de ratos anestesiados .....	47
2.10.12 Avaliação dos efeitos da fração butanólica da <i>S. buxifolia</i> sobre a PAM de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). .....	47
2.11 Análises dos resultados e testes estatísticos .....	47
3 RESULTADOS .....	48
3.1 Efeito vasorrelaxante do extrato bruto da casca e das folhas da <i>S. buxifolia</i> e de suas respectivas frações em anéis de aorta de rato .....	48
3.2 Efeito promovido pela adição de antagonistas dos receptores muscarínicos, bradicininérgicos e histaminérgicos sobre o relaxamento vascular induzido pela fração butanólica das cascas BuOH da <i>S. buxifolia</i> .....	51
3.3 Envolvimento do óxido nítrico e guanilato ciclase solúvel mas não do derivado do ácido araquidônico no vasorrelaxamento promovido pela fração BuOH das cascas da <i>S. buxifolia</i> .....	53
3.4 Ausência de efeito da fração BuOH da casca da <i>S. buxifolia</i> sobre a contração induzida pela fenilefrina e pelo cálcio .....	55
3.5 Ação de bloqueadores de canais de potássio sobre o relaxamento induzido pela fração BuOH das cascas da <i>S. buxifolia</i> em anéis de aorta de rato sem endotélio	

funcional.....	57
3.6 Efeito diurético do extrato bruto e da BuOH das cascas da <i>Scutia buxifolia</i> em ratos <i>Wistar</i> normotensos.....	59
3.7 Efeito hipotensor promovido pela fração BuOH das cascas da <i>Scutia buxifolia</i> (via oral) em ratos normotensos anestesiados.....	63
3.7 Efeito Hipotensor da fração BuOH das cascas da <i>S. buxifolia</i> na pressão arterial média (PAM) em ratos infundidos com fenilefrina, L-NAME e fenilefrina + ODQ.....	64
3.8 Redução da PAM promovida pela fração BuOH das cascas da <i>S. buxifolia</i> em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). ....	67
4 Discussão .....	68
5 CONCLUSÕES.....	76
6 REFERÊNCIAS .....	77
ANEXO A .....	94



## LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	- Fração acetato de etila
4-AP	- 4-Aminopiridina
ACh	- Acetilcolina
ADH	- Hormônio Antidiurético
AMPc	- Monofosfato Cíclico de Adenina
ANOVA	- Análise de variância
ATP	- Adenosina trifosfato
AT <sub>1</sub>	- Receptor para angiotensina II subtipo AT1
AT <sub>2</sub>	- Receptor para angiotensina II subtipo AT2
B <sub>1</sub>	- Receptor para bradicinina subtipo B <sub>1</sub>
B <sub>2</sub>	- Receptor para bradicinina subtipo B <sub>2</sub>
BuOH	- Fração butanólica
BK	- Bradicinina
BK <sub>Ca</sub>	- Canal de K <sup>+</sup> de condutância elevada ativado por Ca <sup>2+</sup>
Ca <sup>2+</sup>	- Íons cálcio
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	- Diclorometano
CO <sub>2</sub>	- Dióxido de carbono
DAG	- Diacilglicerol
DCM	- Fração diclorometano
DMSO	- Dimetilsulfóxido
ECA	- Enzima conversora de angiotensina
EDHF	- Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio
GCs	- Guanilato Ciclase Solúvel
GLI	- Glibenclamida
GMPc	- Monofosfato cíclico de guanosina
GTP	- Trifosfato de Guanosina
H <sub>1</sub>	- Receptor da histamina subtipo 1
H <sub>2</sub> O	- Água
HOE-140	- D-Arg [Hyp <sup>3</sup> , Thi <sup>5</sup> , Dic <sup>8</sup> ]-bradicinina
IK <sub>Ca</sub>	- Canal de K <sup>+</sup> de condutância intermediária ativado pelo Ca <sup>2+</sup>
IP <sub>3</sub>	- Trifosfato de Inositol
K <sup>+</sup>	- Íons potássio

K <sub>ATP</sub>	- Canais de potássio sensíveis ao ATP
K <sub>Ca</sub>	- Canais de potássio ativados por cálcio
K <sub>IR</sub>	- Canais de potássio de influxo retificante
K <sub>V</sub>	- Canais de potássio ativados de voltagem
L-NAME	- N <sup>w</sup> -nitro-L-arginina Metil éster
MLCK	- Quinase da cadeia leve de miosina
Na <sup>+</sup>	- Sódio
NO	- Óxido Nítrico
NOS	- Óxido Nítrico sintase
eNOS	- Óxido Nítrico sintase endotelial
iNOS	- Óxido Nítrico sintase induzida
nNOS	- Óxido Nítrico sintase neuronal
O <sub>2</sub>	- Oxigênio molecular
ODQ	- 1H-[1,2,4] Oxadiazole [4,3-a] quinoxalin-1-one
PNA	- Peptídio Natriurético Atrial
PAM	- Pressão Arterial Média
PGs	- Prostaglandinas
PGI <sub>2</sub>	- Prostaciclina
PIP <sub>2</sub>	- Fosfatidil-Inositol-Bifosfato
PKA	- Proteína quinase A
PKG	- Proteína quinase G
PLC	- Fosfolipase C
PNA	- Peptídio Natriurético Atrial
SHR	- Ratos espontaneamente hipertensos
SK <sub>Ca</sub>	- Canal de K <sup>+</sup> de baixa condutância ativado por Ca <sup>2+</sup>
TEA	- Tetraetilamônio
TXA <sub>2</sub>	- Tromboxano A2

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Efeito vasorrelaxante das frações obtidas das cascas e das folhas da *Scutia buxifolia* em anéis de aorta isolada de rato, na presença e ausência de endotélio vascular.
- Tabela 2: Aumento do volume de urina excretada após a administração oral da fração BuOH das cascas da *S. buxifolia*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Fluxograma do processo de fracionamento dos extratos bruto das cascas e das folhas da *Scutia buxifolia* 39
- Figura 2: Relaxamento dependente e independente de endotélio funcional promovido pela adição dos extratos bruto das cascas e das folhas e fração butanólica das cascas da *S. buxifolia*. 50
- Figura 3: Ausência de envolvimento de receptores muscarínico, bradicininérgicos e histaminérgicos no relaxamento induzido pela fração butanólica das cascas da *S. buxifolia* em anéis de aorta de rato com endotélio funcional.
- Figura 4: Inibição do efeito vasorrelaxante da fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* na presença dos inibidores da óxido nítrico sintase, guanilato ciclase, mas não na presença do inibidor da ciclooxigenase
- Figura 5: Ausência de efeito da fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* sobre a contração induzida pela adição cumulativa de fenilefrina, e a não alteração do efeito contrátil promovidas pela entrada de cálcio e liberação do cálcio intracelular
- Figura 6: Ausência de influência dos bloqueadores de canais de  $K^+$  TEA e GLI sobre o efeito vasorrelaxante da fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* em anéis de aorta de rato com endotélio funcional
- Figura 7: Ação dos bloqueadores de canais de  $K^+$  sobre o relaxamento promovido pela fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* em anéis de aorta de rato sem endotélio funcional
- Figura 8: Efeito diurético do extrato bruto e da fração BuOH das cascas da *S.*

*buxifolia* em animais normotensos tratados via oral

Figura 9: O tratamento oral com o extrato bruto e fração BuOH das cascas não alterou o pH e densidade da urina coletada

Figura 10: Efeito hipotensor da fração BuOH das cascas de *S. buxifolia* em diferentes tempos após a administração aguda pela via oral

Figura 11: Ausência de efeito hipotensor da administração (i.v.) da fração BuOH em ratos normotensos

Figura 12: Efeito hipotensor da fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* administrada pela via endovenosa em ratos *Wistar* anestesiados infundidos com fenilefrina ou L-NAME ou infundidos com fenilefrina e tratados agudamente com ODQ

Figura 13: Registro típico da PAM de ratos normotensos nos experimentos com infusão de fenilefrina

Figura 14: Efeito hipotensor da fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* em ratos SHR

## **ANEXOS**

Anexo A: Preparo dos extratos bruto das cascas e das folhas da *Scutia buxifolia* e seus fracionamentos

## RESUMO

A espécie *Scutia buxifolia* é uma árvore que pertence à família Rhamnaceae. É nativa da América do Sul, sendo encontrada principalmente no estado do Rio Grande do Sul, Uruguai e Argentina. É conhecida como “coronilha”. A casca da *S. buxifolia* é utilizada popularmente na forma de infusão como antihipertensiva e diurética. Apesar do uso popular não encontramos na literatura científica estudos que possam validar ou não a utilização desta planta para tais fins. Em nosso trabalho fizemos estudos *in vitro* e *in vivo* para avaliarmos a possível atividade biológica do extrato bruto hidroalcoólico da casca e das folhas e de suas respectivas frações, diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e butanólica (BuOH) da *S. buxifolia*. Foram utilizados ratos *Wistar* e *SHR* machos (280-320g). Nos estudos *in vitro*, o extrato bruto hidroalcoólico da casca e das folhas promoveram um relaxamento máximo de  $59,49 \pm 12,33\%$  e de  $79,70 \pm 10\%$ , respectivamente, em anéis de aorta com endotélio, previamente contraídas por fenilefrina ( $1 \mu\text{M}$ ), que não foi reduzido a em preparações de aorta sem endotélio funcional. Todas as frações testadas promoveram relaxamento em anéis de aorta com e sem endotélio. Entretanto, as frações AcOEt e BuOH ( $50 \mu\text{g/ml}$ ) das cascas da *S. buxifolia* promoveram um relaxamento máximo de  $73,84 \pm 4,95\%$  e  $94,21 \pm 7,30\%$ , respectivamente. A remoção do endotélio reduziu significativamente (em  $\approx 50\%$ ) esse efeito. O mecanismo de ação envolvido no relaxamento vascular foi investigado com a utilização da fração BuOH da casca da *S. buxifolia*, fração que apresentou maior atividade e demonstrou maior dependência do endotélio para causar vasodilatação. A incubação de L-NAME ( $100 \mu\text{M}$ ) ou de ODQ ( $10 \mu\text{M}$ ), inibidores da enzima óxido nítrico sintase e guanilato ciclase solúvel, respectivamente, aboliu o relaxamento dependente de endotélio causado pela fração BuOH. Em anéis de aorta com endotélio, o efeito vasorrelaxante causado pela fração BuOH não foi reduzido pela incubação prévia de atropina ( $1 \mu\text{M}$ ; antagonista de receptor muscarínico da acetilcolina), HOE-140 ( $1 \mu\text{M}$ ; antagonista seletivo de receptor  $B_2$  da bradicinina), pirilamina ( $1 \mu\text{M}$ ; antagonista seletivo para receptor  $H_1$  da histamina), tetraetilamônio (TEA,  $10 \text{ mM}$ ; um bloqueador não seletivo de canais de  $K^+$ ), ou glibenclamida (GLI,  $10 \mu\text{M}$ ; bloqueador seletivo de canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP). Em anéis de aorta sem endotélio funcional a fração BuOH ( $10$ ,  $30$  e  $100 \mu\text{g/ml}$ ) não modificou a resposta contrátil ao cálcio ou à fenilefrina em meio livre de cálcio extracelular, bem como não alterou a mobilização intracelular de cálcio medida pelo efeito contrátil induzido pela fenilefrina em líquido nutritivo desprovido de cálcio. Entretanto, o relaxamento máximo promovido pela fração BuOH em anéis de aorta sem endotélio funcional foi significativamente reduzido pelos bloqueadores de canais de  $K^+$  TEA ( $10 \text{ mM}$ ), GLI ( $10 \mu\text{M}$ ), 4-aminopiridina ( $1 \text{ mM}$ ; inibidor seletivo de canal de  $K^+$  regulados por voltagem) e iberiotoxina (IbTX,  $100 \text{ nM}$ ; inibidor seletivo de canal de  $K^+$  de alta condutância regulado por  $\text{Ca}^{2+}$ ). A administração oral da fração BuOH ( $10 \text{ mg/kg}$ ) aumentou o volume de urina excretado e reduziu a pressão arterial média

(PAM) de ratos *Wistar* normotensos. Curiosamente, a fração BuOH não reduziu a PAM de animais normotensos quando administrada por intravenosa, mas apresentou efeito hipotensor significativo em ratos espontaneamente hipertensos e em animais normotensos infundidos continuamente com fenilefrina, sendo neste último o qual foi abolido pelo inibidor de guanilato ciclase ODQ. Além disso, a fração BuOH não reduziu a PAM em ratos infundidos com L-NAME. Nossos resultados sugerem que a fração butanólica da casca do tronco da *S. buxifolia* possui um ou mais componentes capazes de causar vasodilatação *in vitro* e *in vivo*, ambos por mecanismos que envolvem a ativação da enzima óxido nítrico sintase e a estimulação da enzima guanilato ciclase.

## ABSTRACT

*Scutia buxifolia* (Rhamnaceae,) is a tree popularly known as “coronilha”. Its barks are popularly used in the form of infusion as antihypertensive and diuretic. Despite the popular use in the scientific literature we found no studies that can validate or not the use of this plant for such purposes. This study discloses that the crude extracts of leaves and bark of *Scutia buxifolia* are able to cause a concentration-dependent relaxation in phenylephrine-contract rat aortic rings. Among the fractions tested, the n-butanolic (BuOH) fraction of bark of *S. buxifolia* had the strongest activity, causing full relaxation (95-100%) in rat aortic rings with functional endothelium, and partial relaxation in endothelium-denuded vessels (35-45%). The non-selective nitric oxide synthase inhibitor L-NAME, as well as the soluble guanylate cyclase inhibitor ODQ, but not the cyclooxygenase inhibitor indomethacin, vanished BuOH fraction-induced endothelium-dependent relaxation. However, the membrane receptor antagonists atropine, HOE-140, and pyrilamine had any effect. Incubation of the non-selective K<sup>+</sup> channel blocker tetraethylammonium (TEA), or the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel blocker glibenclamide did not change the vasorelaxation induced by BuOH fraction in those rings with functional endothelium. On the other hand, in endothelium-denuded preparations, TEA and glibenclamide, as well as the voltage-sensitive K<sup>+</sup> channel blocker 4-aminopyridine, and the high conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel blocker iberiotoxin were able to reduce the maximum relaxation elicited by BuOH fraction. Taken together, our results suggest that the n-butanolic fraction of bark of *S. buxifolia* possess one or more substances able to cause vascular relaxation in rat aortic rings, through both endothelium-dependent and -independent mechanism. The endothelial action of this BuOH fraction is fully related to stimulation of nitric oxide production, and subsequent activation of the soluble guanylate cyclase, while the direct action in the vascular smooth muscle (endothelium-independent relaxation) is, at least in part, mediated by potassium channel opening, mainly the high-conductance calcium-activated subtype. Oral administration of the BuOH fraction (10 mg/kg) increased the volume of urine excreted and reduced mean arterial pressure of normotensive Wistar rats. Interestingly, the BuOH fraction did not reduce MAP of normotensive rats when administered intravenously, but showed significant hypotensive effect in spontaneously hypertensive and normotensive animals continuously infused with phenylephrine, being the latter which was abolished by the

guanylate cyclase inhibitor ODQ. In addition, the BuOH fraction did not reduce MAP in rats infused with L-NAME. Our results suggest that the butanolic fraction of the bark of *S. buxifolia* has one or more components capable of causing vasodilatation *in vitro* and *in vivo*, both through mechanisms that involve the activation of the enzyme nitric oxide synthase and stimulation of the enzyme guanylate cyclase.



## 1 INTRODUÇÃO

A sociedade humana acumula informações sobre o ambiente que a cerca, o que lhe possibilita interagir com ele para prover suas necessidades de sobrevivência. Neste acervo, inclui-se o conhecimento relativo às plantas com as quais estas sociedades estão em contato. Em meio à imensa diversidade de plantas existentes no mundo, o homem desde tempos remotos vem tentando desenvolver medicamentos de origem natural ou derivados sintéticos pela utilização de plantas medicinais para o tratamento das mais variadas doenças que afligem a humanidade. De acordo com a primeira história natural brasileira, elaborada por Wilhem Pies e Georg Marcgraf, integrantes da comitiva de Maurício de Nassau, as informações eram coletadas, fragmentadas e distanciadas do contexto real de onde tinham sido extraídas. As informações sobre o uso de uma planta é transmitida de geração a geração, essa prática sobreviveu ao processo evolutivo e aos avanços tecnológicos, chegando aos dias atuais como grande fonte de recursos terapêuticos (DI STASI, 1995).

As plantas medicinais são importantes para a pesquisa farmacológica e desenvolvimento de medicamentos, não apenas quando a planta é usada diretamente como agente terapêutico, mas também como matéria prima para a síntese de fármacos ou como modelo para compostos farmacologicamente ativos (JAYASURIYA, 1999).

Os constituintes químicos produzidos pelos vegetais podem ser divididos em dois grandes grupos, os metabólitos primário, essencial para a sobrevivência das espécies vegetais que incluem os açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos e seus polímeros derivados, com funções vitais bem definidas e um segundo grupo de compostos químicos que são os metabólitos secundários, que “aparentam” não ter grande utilidade na sobrevivência das espécies. Estes apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular, atividades biológicas marcantes e são encontrados em concentrações relativamente baixas e em determinados grupos de plantas. Entre os metabólitos secundários estão os alcalóides, terpenos, flavonóides e outros (DI STASI, 1995).

As plantas medicinais são frequentemente utilizadas no auxílio das terapias convencionais, principalmente pela facilidade de obtenção e pelo baixo custo, quando utilizadas *in natura*. Porém, sabe-se que as plantas apresentam ampla

diversidade de metabólitos secundários, com inúmeras atividades biológicas (SIMÕES *et al.*, 2001), exigindo uma série de cuidados no seu uso, principalmente pelos efeitos colaterais indesejáveis que podem ocorrer e as interações com outros fármacos que estejam sendo utilizados simultaneamente.

Na tentativa de melhora ou cura de doenças ou picadas de insetos e animais peçonhentos, plantas foram e são amplamente utilizadas por curandeiros, xamãs e pajés no mundo todo. O conhecimento a respeito desta prática milenar é transmitido de geração em geração, perpetuando assim o seu uso como recurso terapêutico popular. Estas informações se tornaram importantes ao longo da história e, por isso, a ciência busca através da etnobotânica e etnofarmacologia, validar o conhecimento popular e disponibilizá-lo em descrições publicadas em livros, revistas ou em trabalhos científicos. O uso por si só de uma planta com fitoterápico não é o suficiente para validá-la como eficaz e segura, isso porque um dos grandes problemas no uso das plantas para o tratamento de doenças é a falta de dados científicos que comprovem sua ação biológica e seu espectro toxicológico. A tradição do uso de uma planta pode nos dar muitas informações úteis para a elaboração de estudos farmacológicos e fitoquímicos. O conhecimento nos permite planejar a pesquisa a partir de um conhecimento empírico já existente (DI STASI, 1995). As plantas apresentam ampla diversidade de metabólitos secundários com inúmeras atividades biológicas. Menos de 10% das plantas utilizadas como medicinais apresentam estudos científicos que garantam a sua eficácia e a sua segurança (SIMÕES, 2001).

O isolamento de compostos de plantas é uma estratégia importante para o desenvolvimento de novos fármacos. Nas últimas décadas tem-se observado o grande interesse da indústria farmacêutica pelo potencial terapêutico das plantas medicinais. Estima-se que 25% de todos os medicamentos do mercado atual são derivados direta ou indiretamente de plantas. Além disso, cerca de 50% das drogas desenvolvidas entre 1981 a 2002 foram obtidas a partir de produtos naturais, análogos semi-sintéticos ou mesmo compostos sintéticos baseados em produtos naturais (KOEHN & CARTER, 2005). Assim, na área farmacêutica, as plantas e os extrativos vegetais fornecem o substrato para a produção de compostos biologicamente ativos ou compostos passíveis de modificações e otimizações estruturais que dão origem às entidades químicas (SCHENKEL, 2001).

Como exemplos de fármacos obtidos a partir de compostos bioativos isolados

de plantas podemos citar centenas de exemplos como a *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae), popularmente conhecida como papoula, planta usada para extração do ópio, cujo componente majoritário é a morfina, isolada por Setürner. Este princípio ativo é usado para o combate à dor desde 1803-04 (FELLOWS, 1992). Podemos citar também a *Digitalis purpúrea* L. e a *Digitalis lanata* Eh. delas foram extraídos glicosídeos cardiotônicos chamados cardenolídeos, sendo que os mais utilizados são a digoxina e a digitoxina. Outro exemplo clássico é o ácido acetilsalicílico, utilizado como analgésico, antipirético e antiinflamatório, que foi sintetizado por Kolbe em 1897 a partir de uma substância ativa, a salicina, originalmente extraída da planta *Salix alba* L. popularmente conhecida como salgueiro (ESPERIDIÃO *et al.*, 1998).

Em nosso planeta existem cerca de 350 a 550 mil espécies de plantas. A grande maioria não possui estudo químico ou farmacológico e somente cerca de 20% foi estudada de alguma maneira quanto ao seu emprego medicinal, a maioria sem grande aprofundamento. Estes dados, em conjunto com os descritos anteriormente, demonstram o enorme potencial das plantas para a descoberta de novos compostos químicos com atividade biológica terapêutica (HOSTETTMANN *et al.*, 2003)

O Brasil é privilegiado nesse contexto, pois ocupa o primeiro lugar em biodiversidade dentre os 17 países mais ricos do mundo, detendo cerca de 20% do total de espécies existentes no planeta (RATES, 2001). Isto representa uma diversidade genética vegetal com valor econômico inestimável para a descoberta de novas moléculas e para o desenvolvimento de novos fármacos. No Brasil 20% da população consome 63% de medicamentos alopáticos comercializados no país. Acredita-se que grande parte da população restante faça uso quase que exclusivo de produtos de origem natural, principalmente plantas, para o tratamento de suas doenças. Na última década registrou-se um aumento expressivo no interesse por substâncias de espécies vegetais (CALIXTO, 2000). Entre os fatores que contribuem para o aumento nesse interesse podemos destacar a comprovação da eficácia de algumas substâncias antitumorais obtidas de plantas, como os alcalóides extraídos da espécie vegetal *Catharanthus roseus* G. Dom (Apocinaceae), descobertos na década de 60, considerados indispensáveis para o tratamento clínico da leucemia (HOSTETTMANN, 2003; CRAGG *et al.*, 1999).

No Brasil, como em vários países, muitas espécies são utilizadas

empiricamente, sem respaldo científico quanto à sua eficácia e segurança (FOGLIO *et al.*, 2006).

Dentre as várias espécies utilizadas pela população podemos destacar a *Scutia buxifolia*, que é uma árvore nativa da região Sul da América do Sul, sendo encontrada principalmente no estado do Rio Grande do Sul, Argentina e Uruguai. Ela é conhecida popularmente como coronilha, sendo usada na forma de infusão de suas cascas como anti-hipertensiva e diurética (WASICKY *et al.*, 1964). Alguns estudos fitoquímicos preliminares revelaram a presença de alcalóides isolados de raízes de *S. buxifolia*, com atividade antimicrobiana (MOREL *et al.*, 2005). Outros estudos de avaliação fitoquímica preliminar da *S. buxifolia* revelaram a presença de cumarinas, ácidos orgânicos, heterosídeos flavônicos, heterosídeos cianogênicos, fenóis e alcalóides. As frações acetato de etila (AcOEt) e butanólica (n-BuOH), obtidas a partir do extrato hidroalcoólico do ramo de *S. buxifolia*, apresentaram uma forte atividade antioxidante e um alto conteúdo de polifenóis e de flavonóides. (BOLIGON *et al.*, 2009).

Tendo em vista as consequências clínicas mundiais geradas pelas doenças cardiovasculares, consideramos importante o investimento em estudos que busquem identificar novas opções de prevenção e tratamento dessas enfermidades (JACOB, 1999).

Apesar do uso da *S. buxifolia* pela população, não encontramos na literatura científica estudos que possam validar, ou não, a utilização desta planta para tais fins. Considerando-se o uso popular e a ausência de dados científicos a respeito, consideramos importante o estudo do efeito hipotensor e ação diurética atribuídos à planta e a investigação do mecanismo pelo qual ela exerce sua ação vasorrelaxante. Para isso, realizamos testes *in vitro* e *in vivo* em ratos, com os extratos brutos da casca e das folhas de *Scutia buxifolia*, bem como de suas respectivas frações.

### **1.1 Hipertensão Arterial**

A associação da hipertensão arterial sistêmica (HAS), conhecida popularmente como pressão alta, com o desenvolvimento de várias doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e insuficiência renal foi estabelecida há muito tempo. As doenças cardiovasculares constituem atualmente um problema de saúde pública importante e são as principais causas de morte no Brasil e no mundo (CHOBANIAN *et al.*, 2003).

A pressão alta ou hipertensão é diagnosticada quando a pressão arterial está igual ou acima de 140/90 mm Hg (V Diretrizes Brasileira de Hipertensão 2006). A hipertensão ocorre quando um dos mecanismos que mantêm a pressão sanguínea em valores considerados saudáveis deixa de desempenhar a sua função reguladora.

A HAS possui alta prevalência, baixas taxas de controle e é um dos mais importantes problemas de saúde pública. A mortalidade por doença cardiovascular (DCV) aumenta progressivamente com a elevação da pressão arterial, em 2001, cerca de 6,7 milhões de mortes no mundo foram atribuídas à elevação da pressão arterial (WILLIAMS, 2010).

No Brasil, em 2007, ocorreram 308.466 óbitos decorrentes de doenças cardiovasculares (MALTA *et al.*, 2009). Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia nas V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (SBC/SBH, 2006) a hipertensão arterial, devido a suas complicações, tais como doença cerebrovascular, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, insuficiência renal crônica e doença vascular de extremidades, apresenta custos médicos e socioeconômicos elevados, decorrentes principalmente das complicações que levam a internações hospitalares.

Segundo o Ministério da Saúde a principal causa de morte em todas as regiões do Brasil é o acidente vascular cerebral, em decorrência da HAS, que acomete as mulheres em maior proporção (LOTUFO *et al.*, 2005). Há uma tendência mundial para o decréscimo da mortalidade, no entanto a mortalidade ainda é elevada no Brasil quando comparada com outros países, tanto para doenças cerebrovasculares como para doenças do coração. Dentre os fatores de risco para mortalidade, a hipertensão arterial responde por 40% das mortes por acidente vascular cerebral e 25% daquelas por doença coronariana (*The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure*). A pressão arterial aumenta linearmente com a idade alcançando até 60% de incidência na faixa etária acima de 65 anos (LESSA, 2001). Dados da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC/SBH, 2006) indicam que em relação à cor a HAS é duas vezes mais prevalente em indivíduos de cor não-branca, sendo até 130% maior nas mulheres negras brasileiras quando comparadas com as mulheres brancas (LESSA, 2001).

Apesar do ganho de peso estar fortemente associado com o aumento da pressão arterial, nem todos os indivíduos obesos tornam-se hipertensos. Estudos

observacionais mostraram que ganho de peso e aumento da circunferência da cintura (obesidade abdominal) são índices prognósticos importantes de hipertensão arterial, sendo a obesidade central um indicador importante de risco cardiovascular aumentado (World Health Organization, 1997).

O consumo de bebidas alcoólicas por períodos prolongados, consumo excessivo de sódio, assim como o sedentarismo, podem aumentar a incidência de hipertensão arterial. Este aumento pode ser até 30% maior do que em indivíduos que praticam alguma atividade física (SBC/SBH, 2006).

No Brasil fatores socioeconômicos influenciam a ocorrência da HAS, sendo mais prevalente em indivíduos com menor escolaridade, tanto pelo desconhecimento da patologia como pela falta de adesão ao tratamento (CESARINO *et al.*, 2008).

Por ser uma doença multifatorial (JACOB, 1999), o tratamento para hipertensão compreende primeiramente medidas não-medicamentosas como, mudança no estilo de vida. O tratamento não-medicamentoso compreende as mudanças alimentares, adotando um estilo saudável de vida, com consumo controlado de alimentos gordurosos, sal, bebidas alcoólicas, evitar o tabagismo, etc. A prática regular de exercícios é recomendada para todos os hipertensos (LEWINGTON *et al.*, 2002; RAINFORTH *et al.*, 2007).

O tratamento medicamentoso associado ao não-medicamentoso objetiva a redução da pressão arterial respeitando-se as características individuais, a presença de doenças ou condições associadas ou características peculiares e a qualidade de vida dos pacientes. São várias as classes de anti-hipertensivos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2005), o tratamento farmacológico se inicia com a monoterapia feita com os diuréticos, inibidores adrenérgicos, bloqueadores dos canais de cálcio, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), bloqueadores do receptor  $AT_1$ , da angiotensina II e vasodilatadores diretos. Em alguns casos se faz necessário a associação de medicamentos, as mais comuns são:  $\beta$ -bloqueador + diurético, inibidor adrenérgico + diurético, inibidor da ECA + diurético, bloqueador dos receptores  $AT_1$  + diurético, bloqueadores de canal de cálcio + diurético e bloqueador de canais de cálcio + inibidores da ECA. Para pacientes em estágios mais graves de hipertensão é recomendado a associação de fármacos anti-hipertensivos (LAGANOVIC, 2010).

Apesar da ampla variedade de agentes anti-hipertensivos, os problemas

cardiovasculares relacionados à hipertensão ainda continuam a afetar milhões de pessoas. O abandono ao tratamento devido aos efeitos adversos causado pelos fármacos é uma constante, principalmente pela falta de conhecimento sobre a doença e o custo elevado dos medicamentos (JACOB, 1999; CHOBANIAN *et al.*, 2003; LA MORENA *et al.*, 2010).

### **1.1.1 Controle fisiológico da pressão arterial**

A pressão arterial (PA) corresponde à força que o sangue bombeado pelo coração exerce contra a parede distensível dos vasos, sendo determinada pelo volume de sangue que sai do coração (débito cardíaco) e a resistência que ele encontra para circular na periferia (resistência periférica vascular). Nos humanos a pressão varia a todo instante para manter o organismo em equilíbrio. No entanto, raramente desvia do valor de referência de 10 a 15% durante ao dia. Um adulto normal apresenta a sua pressão arterial média em torno de 120 mm Hg para a pressão sistólica e 80 mm Hg para diastólica, em episódios com comprometimento circulatório (uma hemorragia, por exemplo) pode chegar a 0 mm Hg, ou aumentar a 160 mm Hg em indivíduos com hipertensão arterial, comprometendo assim a homeostasia. Para compensar essas alterações o organismo controla o fluxo e a pressão do sangue através de uma série de mecanismos de controle da pressão sanguínea, os quais interagem de forma eficaz para produzir respostas apropriadas nas circunstâncias que modificam a pressão arterial. Esses mecanismos são geridos pelo organismo em tempo real, ou seja, de maneira contínua enquanto dormimos, comemos, trabalhamos, etc. Os mecanismos que atuam na regulação da pressão arterial podem ser agrupados de acordo com o tempo necessário à reação para produzir uma resposta (GUYTON, 1991).

A regulação da PA em curto prazo (reação em segundos) é desempenhada pelos barorreflexos, quimiorreflexos e sistema nervoso central. O controle da PA em longo prazo (horas ou dias) é desempenhado pelos rins. Em médio prazo (minutos), a regulação ou modulação ocorre principalmente por ação dos sistemas hormonais (sistema renina-angiotensina, sistema caliceína-cinina, vasopressina, fator natriurético atrial e mediadores endoteliais) (GUYTON, 1991).

O sistema barorreflexo responde com extrema rapidez a alterações da pressão arterial, sendo a primeira linha de defesa contra as manifestações agudas de hipertensão ou hipotensão que ocorrem durante as adaptações fisiológicas como

mudanças posturais, estresse e mudanças no volume sanguíneo. Este reflexo é desencadeado por receptores de estiramento (barorreceptores), localizados principalmente na parede do arco da aorta e na parede interna das carótidas. A ocorrência de uma elevação ou diminuição da pressão arterial promoverá uma modificação estrutural na parede dos vasos, essas modificações irão estimular os barorreceptores que enviam sinais para o sistema nervoso central, sinais de *feedback* são enviados de volta à circulação pelo sistema nervoso simpático, promovendo assim o retorno da pressão arterial a valores aceitáveis (SOUZA NETO *et al.*, 2003).

Os quimiorreceptores são células especializadas que respondem à falta de oxigênio e ao excesso de dióxido de carbono. Toda vez que a pressão arterial cai para um nível crítico, os quimiorreceptores são estimulados e enviam sinais para o centro vasomotor, “excitam” este centro, com consequente elevação da PA. Outra forma de controle da pressão arterial pelo cérebro é conhecida como resposta isquêmica do sistema nervoso central. Quando o fluxo sanguíneo no cérebro diminui ocasionando deficiência nutricional (isquemia cerebral) pela diminuição da concentração de oxigênio ( $O_2$ ) e o aumento da concentração de dióxido de carbono ( $CO_2$ ) no sangue, aciona-se um mecanismo especializado de retorno da PA para a volta da função normal dos neurônios. Assim como a isquemia do sistema nervoso central e os quimiorreceptores, quando estimulados, promovem o restabelecimento da PA para valores que aumentam o fluxo sanguíneo no local afetado, impedindo a depressão nutricional e ou morte das células neuronais; este é um processo que ocorre também durante a prática de exercícios físicos (GUYTON, 1991).

#### **1.1.1.1. Excreção renal**

A formação de urina pelos rins é um fator importante no controle da PA. Os rins, através da excreção de quantidades variáveis de sódio e água, desempenham um papel importante na regulação em longo prazo da pressão arterial. A formação da urina começa com o sangue proveniente das artérias renais penetrando nos capilares do glomérulo sob alta pressão, o que força a saída de líquido sanguíneo para a cápsula renal. O líquido que extravasa do sangue é o filtrado glomerular. A maioria das substâncias existentes no plasma, com exceção das proteínas, é filtrada livremente (glicose, uréia, sais, moléculas de pequeno tamanho), mas à medida que



o filtrado deixa a cápsula de Bowman e avança pelos túbulos ocorre a reabsorção de água e de solutos específicos (GUYTON, 1991)

Quando a pressão arterial aumenta para valores demasiadamente elevados, sistólica acima de 140 mm Hg e diastólica acima de 90 mm Hg, ocasionando um estado de hipertensão (SBC/SBH, 2006), o excesso de pressão nos capilares renais promove um aumento na eliminação de água e sais, resultando assim na diminuição do volume sanguíneo e consequentemente na redução da pressão arterial. Quando ocorre o oposto, ou seja, a queda da pressão arterial, os rins reduzem a formação de urina até que o volume sanguíneo aumente acumulando os líquidos e eletrólitos ingeridos para restabelecer a pressão arterial a níveis aceitáveis. Este é o controle da PA em longo prazo, que pode durar horas ou dias (GUYTON, 1991; OPIE, 1998).

A reabsorção de água pelos rins pode ser modulada pelo hormônio antidiurético (ADH). Um aumento na osmolaridade plasmática ou redução do volume circulatório estimulam a hipófise posterior a liberar ADH. O ADH atua sobre os túbulos renais, provocando o aumento da reabsorção de água do filtrado glomerular. A ingestão de grandes quantidades de água tem o efeito inverso, a osmolaridade diminui, estimulando a hipófise a liberar menos ADH. Em consequência é produzido maior volume de urina, ou seja, a reabsorção de água é menor (VERBALIS, 2003).

#### **1.1.1.2 Sistemas hormonais**

Em médio prazo o controle da pressão arterial através de modificações na função dos rins pode ser efetuado por sistemas hormonais, como o sistema renina angiotensina. Este sistema é ativado quando a pressão arterial cai abaixo dos níveis normais, diminuindo assim o fluxo de sangue para os rins. Esta queda da pressão estimula a secreção de renina que é produzida, armazenada e liberada pelas células justaglomerulares dos rins, para a corrente sanguínea (CASTROP *et al.*, 2010). Esta enzima converte uma proteína plasmática, (substrato de renina) em angiotensina I, a qual é convertida, por ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), em angiotensina II, produto biologicamente ativo (PEACH, 1997). A angiotensina II liga-se a receptores  $AT_1$  localizados na membrana celular e promove a ativação de uma proteína  $G_q/11$ , que por sua vez ativa a fosfolipase C (PLC). Esta ativação desencadeia uma cascata de resposta celular que promove vasoconstrição e consequentemente restabelece a pressão arterial a níveis normais.

Além disso, a angiotensina II parece agir nas glândulas supra-renais

induzindo a liberação de outro hormônio, a aldosterona, produzida no córtex da adrenal. A aldosterona exerce efeito direto sobre os rins que aumenta a reabsorção de sódio e, portanto, promove o aumento de volume sanguíneo e consequentemente o aumento da pressão arterial (GUYTON, 1991; OPIE, 1998). A angiotensina II também se liga a receptores  $AT_2$  e promove a ativação de uma proteína  $G_i$  (inibitória), que antagoniza os efeitos da ativação dos receptores  $AT_1$ , promovendo formação de vasodilatadores como a bradicinina (BK) e óxido nítrico (NO), e consequentemente promovendo vasodilatação (DUKE *et al.*, 2005).

Outros sistemas hormonais como o hormônio antidiurético ou vasopressina também contribuem para a regulação da pressão arterial em médio prazo. A vasopressina é liberada pela glândula hipófise posterior em resposta à diminuição do volume sanguíneo, que pode ocorrer durante uma hemorragia. A vasopressina é um potente vasoconstritor e atua aumentando a reabsorção de água pelos túbulos renais, sem com isso interferir na eliminação de sódio. A reabsorção de água pelos rins aumenta o volume sanguíneo e consequentemente promove o aumento da pressão arterial (GUYTON, 1991; LEE *et al.*, 2003).

Outro sistema hormonal importante para a modulação da pressão arterial é o peptídeo natriurético atrial (PNA), que reduz a pressão arterial promovendo vasodilatação e regulando o volume intravascular. Este hormônio promotor de natriurese foi identificado primeiramente em extrato do miocárdio revelando o coração como um órgão com capacidade endócrina (DE BOLD *et al.*, 1981). Este hormônio promove seu efeito vasodilatador por agir, em receptores de membrana das células musculares lisas por meio de uma proteína G que ativa a enzima efetora, guanilato ciclase, promovendo o aumento da concentração do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (CODY *et al.*, 1986; UEMASU *et al.*, 1993).

Outro mecanismo hormonal importante para a redução da PA é o sistema caliceína-cinina, que promove a redução da pressão arterial através da vasodilatação. As cininas (bradicinina e Lys-bradicinina ou calidina) são potentes peptídeos vasodilatadores e inflamatórios liberados a partir de precursores plasmáticos, os cininogênios, por ação das enzimas caliceínas (BHOOLA *et al.*, 1992). Essas enzimas podem ser ativadas por vários estímulos, como, isquemia, dano tecidual e lipopolissacarídeos (LPS), presentes nas membranas celulares de bactérias. Os efeitos vasodilatadores são mediados principalmente pelo óxido nítrico ou pela prostaciclina, e envolvem a ativação de receptores de bradicinina, subtipos

B<sub>2</sub> (fisiologicamente) ou B<sub>1</sub> (em algumas condições fisiopatológicas) (WIEMER *et al*, 1994).

### 1.1.2 O endotélio vascular

Em 1980 Furchgott e Zawadzki relataram que o endotélio liberava um fator capaz de relaxar a musculatura lisa, o qual mais tarde foi identificado como o óxido nítrico (NO). Esta descoberta acrescentou um importante mecanismo para a regulação ou controle da pressão arterial, através de efeitos locais de substâncias liberadas pelo endotélio capazes de alterar o tônus dos vasos sanguíneos (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980).

O endotélio está localizado na parede interna dos vasos sanguíneos, que são constituídos de três camadas histológicas: a camada externa que é formada por tecido conjuntivo; a camada média, formada por células musculares lisas, que com a estimulação apropriada é responsável pelas respostas contráteis ou de relaxamento nos vasos, alterando o diâmetro interno dos mesmos; e a camada íntima, constituída por uma única camada de células que reveste internamente os vasos sanguíneos. O endotélio tem papéis múltiplos e importantes em eventos fisiológicos e patológicos, como a hipertensão (OPIE, 1998).

As substâncias produzidas e liberadas pelo endotélio desempenham um papel importante na regulação da circulação sanguínea e homeostase vascular. Dentre elas estão os vasoconstritores endotelina (YANAGISAWA *et al.*, 1998), o tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) (ELLIS *et al.*, 1976) e a angiotensina II (formada a partir do angiotensinogênio através da atuação da enzima renina e, em parte, pela enzima conversora de angiotensina endotelial) (VELTMAR *et al.*, 1991). Já os vasodilatadores liberados pelo endotélio são a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) (MONCADA *et al.*, 1976) o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (FELETOU & VANHOUTTE, 1988) e o óxido nítrico (NO) (FURCHGOTT, 1983; HUTCHINSON *et al.*, 1987; IGNARRO *et al.*, 1987<sup>a</sup>; PALMER *et al.*, 1987; FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980).

Através destes mediadores, o endotélio exerce sua influência no fluxo sanguíneo e ainda sobre as células circulantes, como os leucócitos, as plaquetas e sobre substâncias envolvidas na coagulação sanguínea. Em condições fisiológicas normais existe um equilíbrio entre a liberação desses fatores; no entanto, em diversas condições patológicas, como na hipertensão arterial, esse equilíbrio é

alterado com uma consequente atenuação dos efeitos vasodilatadores do endotélio. Todos estes efeitos contribuem para a modulação do tônus vascular e participam no desenvolvimento de complicações aterotrombóticas associadas às doenças cardiovasculares (SCHIFFRIN, 2001).

A liberação de mediadores vasorrelaxante pelo endotélio pode ser estimulada por substâncias endógenas, como, por exemplo, a acetilcolina (ACh), a bradicinina (BK) e a histamina, ou ainda por estímulos mecânicos, como o estresse de cisalhamento (conhecido em Inglês como *shear stress*). O estresse de cisalhamento é um estímulo físico gerado pelo atrito do fluxo sanguíneo sobre a camada íntima dos vasos. Substâncias endógenas e este atrito parecem promover a liberação de mediadores endoteliais vasorrelaxante como NO, a PGI<sub>2</sub> ou EDHF (FRANGOS *et al.*, 1985; CAMPBELL & GAUTHIER, 2002; BOO & JO, 2003), os quais atuam sobre a camada muscular e relaxam os vasos. O aumento gerado no diâmetro dos vasos provoca a redução proporcional da resistência periférica total e da pressão arterial. Da mesma forma, estímulos que liberam vasoconstritores endoteliais (como a endotelina) promovem redução no diâmetro vascular, o que resulta no aumento da pressão arterial. A vasodilatação e a vasoconstrição, portanto, decorrem de alterações geradas por estímulos químicos ou físicos que atuam nas diferentes camadas constituintes dos vasos. Na camada de células endoteliais estes estímulos podem promover a liberação de substâncias vasodilatadoras ou vasoconstritoras que atuam diretamente nas células do músculo liso, ocasionando relaxamento ou contração, modificando assim o tônus vascular

### **1.1.3 Participação do óxido nítrico no relaxamento dependente de endotélio**

O tônus vascular resulta das interações entre os mecanismos de controle neural e endoteliais. Dependendo das circunstâncias biológicas e ambiental um dos mecanismos pode ter mais influência que o outro. A liberação de substâncias vasoativas pelo endotélio pode ser de maior importância para respostas diretas nos vasos sanguíneos, para mudanças locais (LINCOLN & BURNSTOCK, 1990).

Um dos principais mediadores endoteliais que possui ação vasorrelaxante é o NO, que é sintetizado por ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) sobre o aminoácido L-arginina. O NO está envolvido em diversas funções fisiológicas, incluindo neurotransmissão, regulação do tônus dos vasos sanguíneos e da resposta imune (BREDT *et al.*, 1991).

Além das três isoformas de NOS, neuronal (NOS I ou nNOS) endotelial (NOS II ou eNOS) e induzida (NOS III ou iNOS), recentemente foi descrita a NOS mitocondrial (ELFERING *et al.*, 2002). Todas as isoformas são conhecidas por regularem diferentes funções (GARTHWAITE, 2008).

O mecanismo de síntese de NO nas células do endotélio pode ser estimulada pela ação de agonistas em receptores específicos, localizados na membrana das células endoteliais. Esses receptores via proteína G, aumentam a atividade da enzima efetora fosfolipase C (PLC). A PLC, uma vez ativada, promove a hidrólise do fosfatidil-inositol-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) presente na membrana celular, originando o inositol 1,4,5, trifosfato (IP<sub>3</sub>) e o diacilglicerol (DAG) (GRIFFITH *et al.*, 1984). O IP<sub>3</sub> age nos estoques intracelulares de Ca<sup>2+</sup> induzindo a liberação deste íon, que está armazenado no retículo sarcoplasmático. O aumento da concentração de cálcio intracelular livre permite que este se ligue à calmodulina, formando o complexo cálcio calmodulina, que estimula a óxido nítrico sintase do tipo III (endotelial), dando início à síntese do NO (MONCADA *et al.*, 1989). É relatada a existência de canais de cálcio sensíveis ao IP<sub>4</sub> (inositol 1,3,4,5-tetrafosfato) e insensíveis ao IP<sub>3</sub>, localizados nas células endoteliais. Estes canais podem estar envolvidos no influxo transmembrana do Ca<sup>+2</sup> para as células endoteliais (LUCKHOFF & CLAPHAM, 1992), ou ainda, no relaxamento vascular pelo estresse de cisalhamento e na interação agonista–receptor nas células endoteliais (BASSENGE *et al.*, 1987). Por sua vez, o DAG induz a estimulação da proteína quinase C (PKC), que pode fosforilar a NOS III, causando uma forte diminuição na sua atividade catalítica e na produção de NO (BREDT *et al.*, 1992). Isto pode explicar a inibição do relaxamento vascular pela histamina em artéria pulmonar de cobaias após a ativação da PKC pelo éster de forbol (ativador direto da PKC) (WEINHEIMER *et al.*, 1986).

O NO, depois de sintetizado, difunde-se para a camada muscular lisa do vaso causando a estimulação da guanilato ciclase solúvel ou citosólica (GCs), provavelmente por se ligar ao grupo heme dessa enzima (STONE & MARLETTA, 1995). A ativação da GCs gera um aumento da concentração citosólica do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). Este nucleotídeo ativa a proteína quinase G (PKG) que, dentre outras funções, parece fosforilar a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK), tornando-a inativa e induzindo relaxamento (RAPOPORT *et al.*, 1983; RAPOPORT & MURAD, 1983). Uma segunda via de ação da PKG é a ativação de canais de K<sup>+</sup>, ocasionando hiperpolarização e consequente relaxamento

vascular (ARCHER *et al.*, 1994).

É importante destacar que qualquer dano ao endotélio vascular perturba o equilíbrio/balanco entre vasoconstritores e vasodilatadores e inicia uma série de eventos que incluem o aumento da permeabilidade vascular, agregação plaquetária, adesão de leucócitos e produção de citocinas (ROSS, 1999). A disfunção endotelial que é caracterizada pela deficiência de óxido nítrico é um importante fator de risco para a hipertensão arterial e doenças cardiovasculares (TÖRÖK, 2008).

#### **1.1.4 Prostaciclina**

Assim como o óxido nítrico, a prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ) atua localmente promovendo vasodilatação.  $\text{PGI}_2$  é o produto mais abundante do ácido araquidônico produzido no tecido vascular pela ciclooxigenase (MONCADA & VANE, 1979). A síntese da  $\text{PGI}_2$  se inicia com a ativação da fosfolipase  $\text{A}_2$ , que age sobre fosfolípidios de membrana promovendo a liberação do ácido araquidônico que os compõe, que é oxidado e reduzido pela ciclooxigenase (FERREIRA *et al.*, 1971), e, finalmente é convertido a prostaciclina pela enzima prostaciclina sintase (SMITH *et al.*, 1996; VANE *et al.*, 1998). A  $\text{PGI}_2$  age nas células do músculo liso vascular promovendo vasorrelaxamento por atuar em receptores  $\text{IP}_1$  (NAKAGAWA *et al.*, 1994), na membrana das células. Estes receptores estão acoplados a uma proteína G que estimula o aumento da concentração citosólica do monofosfato cíclico de guanosina ( $\text{AMPc}$ ), o qual promove a ativação da proteína quinase A (PKA). Estudos iniciais mostraram que esta quinase impede a interação actina-miosina, promovendo assim a relaxamento vascular (HOPKINS & GORMAN, 1981; BENNETT, 1995). Entretanto, dependendo da artéria ou da espécie em questão, a prostaciclina pode promover a hiperpolarização, o que envolve a abertura de um ou mais canais de potássio. Canais de potássio sensíveis ao ATP ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ), canais de potássio de alta condutância ativados por cálcio ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) e canais de potássio ativados por voltagem ( $\text{BK}_{\text{v}}$ ) podem, todos, estar associados ao relaxamento induzido pela prostaciclina (FELETOU & VANHOUTTE, 2006), especialmente em vasos de microcirculação.

#### **1.1.5 Canais de potássio**

O endotélio vascular desempenha um papel importante no controle da resistência vascular periférica e da pressão arterial através da liberação de fatores

relaxantes derivados do endotélio, dentre os quais se incluem o NO, a  $\text{PGI}_2$  e o ainda não totalmente caracterizado fator hiperpolarizante derivado de endotélio (EDHF). Até o momento esses três fatores são considerados responsáveis pelo relaxamento do músculo liso vascular, dependente de endotélio, que em muitos vasos, envolve a hiperpolarização da membrana celular pela ativação dos canais de potássio no músculo liso vascular (BRAYDEN, 1990; TARE *et al.*, 1990). Dependendo do tipo de vaso, os fatores liberados pelo endotélio podem ativar um ou mais de canais de potássio no músculo liso vascular (WALDRON & COLE, 1999). Assim, os canais de  $\text{K}^+$  contribuem para a regulação da contração e relaxamento do músculo liso vascular e estão envolvidos na regulação do potencial elétrico excitável de membrana das células do músculo liso, incluindo as células do músculo liso vascular. Estímulos que promovam a abertura desses canais levam ao efluxo de íons  $\text{K}^+$  para o meio extracelular, resultando numa hiperpolarização, que está associada ao fechamento dos canais de cálcio dependentes de voltagem, levando à redução na entrada de cálcio para o meio intracelular e consequentemente promovendo a vasodilatação (NELSON & QUAYLE, 1995). Por sua vez, a inibição dos canais de  $\text{K}^+$  ocasiona a despolarização da membrana, que promove a abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem, ocorrendo a entrada de íons cálcio para o meio intracelular e consequente ativação da maquinaria contrátil no músculo liso vascular.

Podemos distinguir quatro tipos de canais de  $\text{K}^+$  no músculo liso vascular que diferem entre si pelas suas propriedades funcionais: canais de  $\text{K}^+$  dependentes de voltagem ( $\text{K}_V$ ), canais de  $\text{K}^+$  sensíveis ao ATP ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ), canais de  $\text{K}^+$  retificantes ( $\text{K}_{\text{IR}}$ ) e os canais de  $\text{K}^+$  ativados pelo cálcio ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ) (NELSON & QUAYLE, 1995; STANDEN & QUAYLE, 1998).

Esses canais podem ser ativados por diferentes estímulos: os canais de potássio sensíveis ao trifosfato de adenosina (ATP) respondem a alterações do metabolismo celular, o aumento de ATP intracelular inibe o canal, e o aumento de difosfato de adenosina (ADP) aumenta a atividade do canal. Quando a concentração intracelular de ATP está dentro dos limites fisiológicos normais a probabilidade desses canais estarem abertos é baixa (NELSON & QUAYLE, 1995). Os  $\text{K}_{\text{ATP}}$  podem ser bloqueados por drogas hipoglicemiantes como a glibenclamida, derivada da sulfoniluréia, sendo este o inibidor mais frequentemente usado em estudos do músculo liso arterial (BEECH *et al.*, 1993; XU & LEE, 1994; NELSON & QUAYLE,

1995; QUAYLE *et al.*, 1995).

Os canais de potássio ativados por voltagem ( $K_V$ ), presentes na membrana do músculo liso vascular, são ativados quando ocorre a despolarização celular. A ativação do canal permite o efluxo de potássio, resultando na repolarização da membrana e o retorno do potencial ao estado de repouso. A ativação dos  $K_V$ , dessa forma, limita a despolarização e mantém o tônus vascular (NELSON & QUAYLE, 1995; SOBEY, 2001; KOROVKINA & ENGLAND, 2002). Os canais  $K_V$  podem ser inibidos de forma seletiva pela 4-aminopiridina, que é usada experimentalmente para distinguir esses canais dos canais de potássio ativados por cálcio de grande condutância, que também podem ser ativados pela despolarização da membrana (OKABE *et al.*, 1987; SMIRNOV & AARONSON, 1992; NELSON & QUAYLE, 1995; SOBEY, 2001).

Os canais  $K_{IR}$  são abundantes no músculo liso de vasos de resistência de pequeno diâmetro (KNOT *et al.*, 1996; QUAYLE *et al.*, 1996; PARK *et al.*, 2006a). Esses canais permitem o influxo de íons  $K^+$  à medida que a membrana da célula hiperpolariza e por saída de íons  $K^+$  quando o potencial de membrana aumenta. Esses canais são ativados por hiperpolarização da membrana celular, o oposto dos canais  $K_V$  e  $K_{Ca}$ , que são ativados pela despolarização da membrana (NELSON & QUAYLE, 1995; FOZARD & MANLEY, 2001).

Os canais de  $K^+$  ativados pelo cálcio ( $K_{Ca}$ ) são divididos de acordo com a permeabilidade a esse íon em canais de condutância elevada ( $BK_{Ca}$ ), de condutância intermediária ( $IK_{Ca}$ ) e de condutância baixa ( $SK_{Ca}$ ). Os canais de  $K_{Ca}$  são ativados pelas mudanças na concentração intracelular de cálcio que ocorrem durante a despolarização da membrana celular, a ação despolarizante do influxo de cálcio é compensada pela ativação dos canais de  $K_{Ca}$ , que resulta na hiperpolarização e conseqüentemente no bloqueio do influxo de cálcio, contribuindo para a manutenção do potencial de membrana (NELSON & QUAYLE, 1995; WALDRON & COLE, 1999; PARK *et al.*, 2007a).

Algumas toxinas obtidas do veneno de alguns animais são utilizadas como bloqueadores de canais de  $K^+$ . A iberiotoxina (IbTX), isolada do veneno de escorpião, é usada experimentalmente para bloquear seletivamente os canais de  $K^+$  ativados por cálcio de condutância elevada, sendo descrita como um bloqueador altamente seletivo para este subtipo de canal, incapaz de afetar outros subtipos. Já a caribdotoxina, além de bloquear os canais de  $BK_{Ca}$ , bloqueia também  $IK_{Ca}$  e  $K_V$



(MILLER *et al.*, 1985; LANGTON *et al.*, 1991; GIANGIACOMO *et al.*, 1992; NELSON & QUAYLE, 1995).

Os canais de potássio podem ser modulados por substâncias vasoativas, vasoconstritoras ou vasodilatadoras. A ativação dos BK<sub>Ca</sub> por fatores derivados do endotélio, como NO, PGI<sub>2</sub> e EDHF foi estabelecido pela inibição seletiva do relaxamento dependente de endotélio pela iberiotoxina ou pela caribdotoxina em condições que estas respostas foram distinguidas (TANIGUCHI *et al.*, 1993; PLANE & GARLAND, 1996). Alguns vasodilatadores atuam via óxido nítrico (NO)-guanilato ciclase solúvel (GCs) aumentando a concentração do GMPc, que consequentemente ativa a proteína quinase dependente de GMPc (PKG) (STANDEN & QUAYLE, 1998). Após estimulação da PKG pelo NO ou por nitrovasodilatadores ocorre ativação dos BK<sub>Ca</sub> (WILLIAMS *et al.*, 1988; ROBERTSON *et al.*, 1993). Além disso, sabe-se que o óxido nítrico pode ativar diretamente o BK<sub>Ca</sub> (BOLOTINA *et al.*, 1994). Na verdade, tanto o óxido nítrico como a prostaciclina podem hiperpolarizar as células do músculo liso vascular e causar relaxamento atuando em canais de potássio (PARKINGTON *et al.*, 1993; CORRIU *et al.*, 1996).

Várias outras substâncias, como por exemplo, metabólitos do ácido araquidônico derivados de ciclooxigenase, monóxido de carbono (CO), espécies reativas de oxigênio, sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) e peptídeos, são liberados por células endoteliais. Estes fatores ativam diferentes famílias de canais de K<sup>+</sup> e hiperpolarizam as células do músculo liso vascular (FELETOU & VANHOUTTE, 2009), podendo ser responsáveis pelas ações até agora atribuídas ao EDHF.

Em resumo, os canais de K<sup>+</sup> desempenham um papel importante na manutenção do tônus vascular assim como na regulação do potencial de membrana das células do músculo liso vascular. O comprometimento das funções dos canais de K<sup>+</sup> já foi estabelecido em algumas condições patológicas como a hipertensão, o diabetes e lesões causadas por isquemia-reperfusão, dentre outros (KO *et al.*, 2008). Os estudos de plantas com potencial farmacológico que possam ter como alvo os canais de K<sup>+</sup> podem contribuir para desenvolvimento de terapias para o tratamento dos distúrbios vasculares.

#### **1.1.6 O cálcio no músculo liso vascular**

A hipertensão arterial é uma doença multifatorial e suas complicações em órgãos alvo representam um grande fator de risco para as populações. As funções do endotélio são um importante mecanismo de controle vascular pela liberação de substâncias vasoativas. A pressão arterial elevada é causada por inúmeros fatores, uns dos fatores importantes são as alterações que podem ocorrer no sistema vasoativo atuando sobre as células do músculo liso vascular. O equilíbrio entre os sistemas vasodilatadores e vasoconstritores é fundamental para a definição do tônus vascular, diminuindo ou aumentando a resistência vascular (PINTÉROVÁ *et al.*, 2009).

O cálcio é um cátion de fundamental importância em diversos mecanismos de controle celular, praticamente todas as respostas celulares são reguladas por alterações nas concentrações de cálcio livre no meio intracelular (STREB *et al.*, 1983).

A contração no músculo liso vascular é regulada principalmente por aumento na concentração de cálcio livre no citosol. Estímulos que promovam o aumento da concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular nas células do músculo liso induzem à contração pela ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  à calmodulina, formando o complexo  $\text{Ca}^{2+}$  + calmodulina. O aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular pode ocorrer devido à entrada de cálcio através da membrana celular ou por liberação do cálcio armazenado no retículo sarcoplasmático. A liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  armazenado ocorre após a formação de segundos mensageiros como o inositol 1, 4, 5-trifosfato intracelular ( $\text{IP}_3$ ) (STREB *et al.*, 1983).

Geralmente o  $\text{Ca}^{2+}$  entra para o meio intracelular passando por um canal de cálcio que se abre em resposta há inúmeros estímulos. O influxo de cálcio tem um papel fundamental na contração vascular, porque a contração sustentada dificilmente é mantida na ausência do cálcio extracelular. A entrada de cálcio através da membrana depende da função dos canais de cálcio regulado por voltagem, no músculo liso vascular o canal particularmente relevante é o do tipo-L, e canais de  $\text{Ca}^{2+}$  independentes de voltagem (TYKOCKI & WATTS, 2010).

A contração pode ser desencadeada por uma série de eventos, como a ligação de um hormônio ou do neurotransmissor ou ao seu receptor de membrana específico ou pela ativação mecânica. Estes receptores de membrana estão acoplados a uma proteína G, que por sua vez estimula a atividade da fosfolipase C (PLC), esta enzima é específica para a formação de segundos mensageiros como

IP<sub>3</sub> e o diacilglicerol (DAG) a partir do fosfolipídio de membrana fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato. O IP<sub>3</sub> se liga a receptores específicos no retículo sarcoplasmático e promove a liberação de íons Ca<sup>2+</sup> dos estoques intracelulares para o citosol. O aumento na concentração intracelular de cálcio leva à ativação do complexo cálcio calmodulina (a calmodulina ocorre sob forma livre no citosol ou como sub-unidade da glicogênio fosforilase quinase, é uma pequena proteína com quatro sítios de ligação, onde as moléculas de Ca<sup>2+</sup> se acoplam), o complexo Ca<sup>2+</sup> + calmodulina ativa uma proteína kinase C (PKC), que ativa a quinase da cadeia leve de miosina (MLCK) e esta irá causar a fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC), a cadeia leve da miosina uma vez fosforilada permite a interação da actina com a miosina induzindo à contração da musculatura lisa. O influxo de Ca<sup>2+</sup> pode ocorrer também pela ativação dos canais de Ca<sup>2+</sup> tipo-L, que se abrem em resposta a despolarização da membrana celular (KARAKI *et al.*, 1997; WEBB, 2003).

A diminuição da concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular promove o relaxamento das células do músculo liso vascular, assim como também o aumento da atividade da fosfatase da MLC, que inibe a atividade da MLCK. Os receptores de membrana operados por voltagem e por ligantes são alvos importantes para a modulação da contração, aumentando ou diminuindo o influxo de Ca<sup>2+</sup>. Alterações na manutenção da concentração do Ca<sup>2+</sup> intracelular têm sido relacionadas como possíveis distúrbios no processo contrátil do músculo liso vascular. Mudanças na afinidade, número, ou no subtipo de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos levando a um aumento na vasoconstrição também estão relacionadas com a hipertensão arterial (HILGERS & WEBB, 2005). Assim, fármacos que inibam o influxo de cálcio através dos canais de cálcio voltagem dependentes, já são utilizados para o tratamento da hipertensão, como por exemplo, a nifedipina (bloqueador de canal de cálcio) promove a diminuição da PA por diminuir o influxo de Ca<sup>2+</sup> (RICHARD, 2005).

## 1.2 *Scutia buxifolia*

A espécie *Scutia buxifolia* (Rhamnaceae) é uma árvore de crescimento lento, seu tronco aumenta aproximadamente 2 mm de largura por ano podendo chegar a 6 metros de altura, apresenta espinhos e floresce na primavera. Suas folhas são simples, opostas ou sub-opostas, possuem a forma elíptica a lanceolada e medem de 1,5 a 4 cm de comprimento por 1 a 2 cm de largura. São inteiras e as vezes podem se apresentar dentadas. Suas flores são pequenas, de cor amarelo

esverdeadas e floração na primavera. Seus frutos são pequenos medindo em média 3 a 5 mm de diâmetro e quando maduros são escuros. É uma planta nativa do Sul do Brasil, Norte da Argentina e do Uruguai. Por sua madeira ser resistente e pesada é utilizada para a fabricação de móveis, cerca - viva e muito usada como lenha, pois possui alto poder calórico (Flora Digital do Rio Grande do Sul).

Ela é popularmente conhecida como “coronilha, canela-de-espinho ou espinho-de-touro”. No Rio Grande do Sul ocorre principalmente em florestas junto com a Araucária, florestas ribeirinhas na Serra do Sudeste e do Litoral Sul (SOBRAL *et al.*, 2006).

No Brasil é usada na forma de infusão em água de suas cascas com anti-hipertensiva e diurética (WASICKY *et al.*, 1964).

Estudos fitoquímicos da *S. buxifolia* indicaram a presença de cumarinas, ácidos orgânicos, heterosídeos flavônicos, heterosídeos cianogênicos, fenóis e alcalóides. As frações acetato de etila e butanólica, obtidas a partir do fracionamento do extrato hidroalcoólico dos ramos, apresentaram forte atividade antioxidante, superior à apresentada pelo ácido ascórbico usado como referência e um alto conteúdo de polifenóis e de flavonóides. A quantificação de compostos derivados de flavonóides por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) indicou a presença de quercetina, isoquercitina e rutina, sendo a quercetina o flavonóide encontrado em maior concentração (BOLIGON *et al.*, 2009).

É bem descrito na literatura os benefícios cardiovasculares e as propriedades antioxidantes (ENKHMAA *et al.*, 2005; MOTOYAMA *et al.*, 2009; VITOR *et al.*, 2004; PEREZ & DUARTE *et al.*, 2010), vasodilatadora (PEREZ & DUARTE, 2010), anti-hipertensiva (EMURA *et al.*, 2007) promovida pelos flavonóides.

Vários autores relatam que a diminuição na produção de NO e a desativação do relaxante derivado de endotélio por ânions superóxido, diminuindo assim a biodisponibilidade do NO tem relação com a etiologia da disfunção endotelial na hipertensão e na diabetes (ENDEMANN & SCHIFFRIN, 2004; AJAY *et al.*, 2007). Ajay e colaboradores demonstraram também que a administração de flavonóides diminui o tônus vascular e inibe a ação de agonistas de promoverem contração em artéria isolada de rato, pela ativação da via NO, guanilato ciclase solúvel e GMPc (AJAY *et al.*, 2003; AJAY *et al.*, 2007). Garcia-Saura e colaboradores demonstraram experimentalmente que o tratamento crônico de animais hipertensos, com o flavonóide antioxidante quercetina reduziu a pressão arterial e promoveu uma

melhora na resposta do relaxamento dependente de endotélio (GARCIA-SAURA *et al.*, 2005).

Com base na literatura científica e com os dados preliminares fitoquímicos obtidos com a planta *Scutia buxifolia* achamos promissor os estudos que levem a compreensão do mecanismo de ação pelo qual os constituintes químicos possam atuar promovendo a vasodilatação em ratos normotensos e espontaneamente hipertensos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

— Estudar os efeitos cardiovasculares dos extratos brutos e frações das cascas e folhas da planta *Scutia buxifolia*.

### 2.2 Objetivos específicos

— Avaliar o efeito vasorrelaxante dos extratos e frações obtidos das cascas e das folhas da *S. buxifolia*, *in vitro*;

— Verificar a importância do endotélio vascular no efeito vasorrelaxante dos extratos e frações obtida da *S. buxifolia*, *in vitro*.

— Analisar o envolvimento de receptores, muscarínicos (tipo M<sub>3</sub>), bradicinérgicos (tipo B<sub>2</sub>) e histaminérgicos (tipo H<sub>1</sub>), no efeito induzido pela fração da *Scutia buxifolia* que apresentou maior atividade relaxante, *in vitro*;

— Averiguar o envolvimento da via óxido nítrico/guanilato ciclase e dos derivados do ácido araquidônico no efeito da fração com maior efeito vasorrelaxante;

— Determinar o efeito da fração com maior atividade sobre a contração induzida pela fenilefrina;

— Investigar a importância de alterações na mobilização de cálcio intra e extracelular no efeito da fração com maior atividade *in vitro*;

— Analisar a participação de canais de K<sup>+</sup> no efeito vasorrelaxante da fração com maior atividade vasorrelaxante, *in vitro*;

— Avaliar a atividade diurética aguda do extrato bruto da casca da *Scutia buxifolia* e sua fração butanólica *in vivo*;

— Examinar a atividade hipotensora e o decurso temporal do efeito da

administração oral da fração butanólica com maior atividade diurética em ratos normotensos, *in vivo*;

— Investigar os mecanismos envolvidos na atividade hipotensora da fração butanólica, *in vivo*;

— Analisar o efeito hipotensor da fração butanólica em animais espontaneamente hipertensos (SHR).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**Material botânico

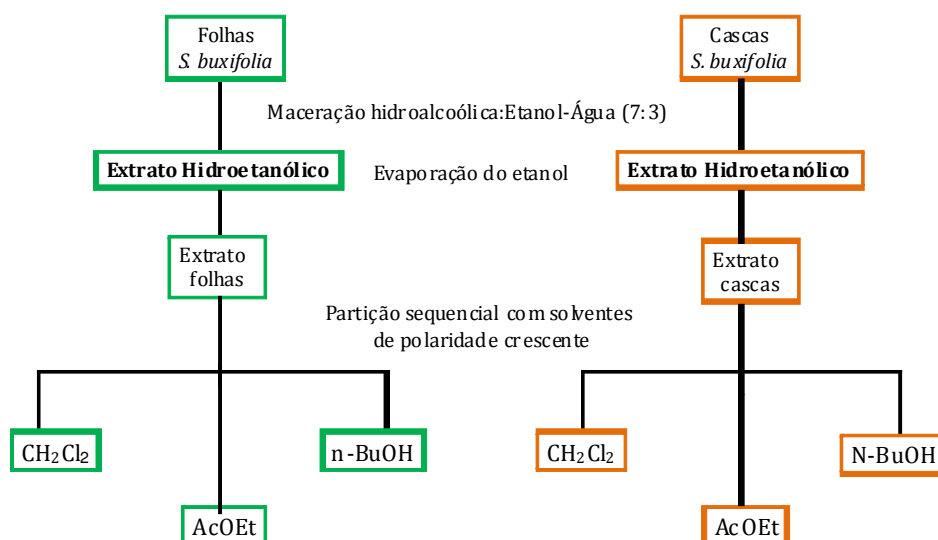
As folhas e cascas do tronco de *Scutia buxifolia*, que pertence à família Rhamnaceae, foram coletadas em outubro de 2007, no município de Dom Pedrito, no estado do Rio Grande do Sul (coordenadas 30°59'09"S e 54°27'44"W). Um exemplar da espécie foi identificado pela professora Nelci Rolim Basto Zacchia e o material testemunho (exsicata) está depositado no herbário do Departamento de Biologia da UFSM, catalogado sob o número de registro SMBD 10919.

#### **2.4 Preparo do extrato bruto das cascas e das folhas e frações da *Scutia buxifolia***

O material vegetal utilizado neste trabalho foi coletado e processado como descrito no artigo publicado por BOLIGON *et al.* (2009), do Departamento de Farmácia Industrial da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS, Brasil) (Anexo, A).

Para facilitar o entendimento do nosso trabalho na figura 1 temos o fluxograma do fracionamento dos extratos brutos das cascas e das folhas da *Scutia buxifolia*.

## ESQUEMA DE FRACIONAMENTO



**Figura 1: Fluxograma do processo de fracionamento do extrato bruto das cascas e das folhas obtidos da *Scutia buxifolia*.**  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  - fração diclorometano;  $\text{AcOEt}$  - fração acetato de etila;  $n\text{-BuOH}$  - fração butanólica.

### 2.5 Material biológico

Os animais utilizados para a realização deste trabalho foram ratos machos normotensos, variedade *Wistar*, e ratos espontaneamente hipertensos (SHR), pesando entre 160-250 g, com aproximadamente 3 meses de idade, fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Até a realização dos experimentos os animais foram mantidos sob temperatura controlada de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , em ciclo claro/escuro de 12 horas e com acesso livre à água e ração padrão. Vinte e quatro horas antes dos experimentos de pressão arterial os animais foram transportados até o laboratório para a ambientação, para que sua pressão arterial média não apresentasse alterações, sendo mantidos sob condições controladas de temperatura e luminosidade com água e ração à vontade. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações para os cuidados com os animais de laboratório. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da UFPR (autorização número, 454).

## 2.6 Drogas, sais e reagentes

Para a execução dos protocolos experimentais foram utilizadas as seguintes drogas, sais e reagentes: cloreto de sódio (NaCl, 118 mM), cloreto de potássio (KCl, 4,6), cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 2,5 mM), sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5,7), dihidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,1 mM), bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ , 25 mM), D-Glucose, acetilcolina (ACh), (todos Merck; Alemanha); fenilefrina, N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), indometacina, bradiginina, histamina, glibenclamida, tetraetilamônio, D-Arg [ $\text{Hyp}^3$ ,  $\text{Thr}^5$ , D-Tic $^7$ , Dic $^8$ ]-bradiginina (HOE-140), 1H-[1,2,4]Oxadiazole[4,3-alquinoxalin-1-one (ODQ), pirilamina, iberiotoxina (IbTX) (todos comprados da Sigma Chemical; Saint Louis, EUA), xilazina e cetamina (Bayer). Todos os sais foram preparados no momento de uso e, exceto quando descrito, solubilizados em água destilada (solução estoque), sendo as diluições das drogas (obtidas a partir das soluções estoques) preparadas com líquido nutritivo de Krebs. O estoque de bradiginina foi preparado em HCl (0,01 N). A glibenclamida foi preparada em solução de dimetilsulfóxido (DMSO). O extrato bruto da casca e as frações foram dissolvidos em solução de Krebs, com exceção do extrato bruto das folhas, o qual foi preparado em solução de dimetilsulfóxido (DMSO). O volume de DMSO adicionado às preparações de anel de aorta, tanto no caso da glibenclamida como no caso do extrato bruto das folhas da *S. buxifolia*, não interferiu na resposta normal do tecido a agentes constritores e dilatadores.

## 2.7 Procedimento para o isolamento de aorta torácica de rato

Os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg), administrada pela via intramuscular, a cavidade torácica aberta e a aorta foi cuidadosamente retirada e colocada em um recipiente (placa de Petri) contendo solução nutritiva aquecida a 37 °C. O tecido conectivo foi removido cuidadosamente e a camada muscular seccionada em anéis medindo aproximadamente 3 a 4 mm de comprimento. Estes anéis foram fixados por meio de hastes metálicas em suporte de acrílico e acondicionadas em cubas de vidro (com capacidade máxima de 2 ml) contendo solução nutritiva de Krebs-Henseleit (sob temperatura de 37 °C, aerada constantemente com solução carbogênica, 95%  $\text{O}_2$  e 5%  $\text{CO}_2$ ). Uma das extremidades da haste estava conectada a um transdutor de força que, acoplado a um sistema computadorizado permitiu o registro de contrações isométricas. A preservação de endotélio funcional foi assegurada na montagem dos experimentos,



exceto em alguns protocolos onde o endotélio foi removido delicadamente pela fricção da camada interna da aorta com uma haste metálica.

Os anéis de aorta foram submetidos individualmente a uma tensão constante de 1 g durante 60 minutos, período reservado para a estabilização das preparações antes do início de cada protocolo experimental. O tempo de 60 minutos também foi respeitado nos intervalos entre as estimulações. Neste período, o líquido nutritivo foi substituído a cada 15 minutos e a tensão reajustada a 1 g quando necessário.

Após o período de estabilização as preparações foram expostas à solução de KCl (60 mM) para verificação da responsividade dos anéis de aorta. Após um novo período de 30 minutos para restabilização das preparações (novamente na presença de solução nutritiva de Krebs), foi adicionado acetilcolina (1  $\mu$ M), durante a fase tônica da contração promovida pela fenilefrina (1  $\mu$ M), para a confirmação da presença ou ausência de endotélio funcional. Os anéis de aorta que obtiveram um relaxamento igual ou superior a 80% foram considerados com endotélio funcional. Ao líquido nutritivo utilizado nos protocolos foi adicionado dexametasona (0,1  $\mu$ M), para inibição da síntese de proteínas que poderiam alterar a responsividade das preparações, dentre as quais a NOS II, uma vez que os experimentos não foram realizados com soluções estéreis.

## **2.8 Metodologia para o registro direto da pressão arterial em ratos anestesiados**

Ratos *Wistar* ou SHR machos e de aproximadamente três meses de idade, foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg), administradas pela via intramuscular e suplementadas quando necessário. O animal foi fixado em decúbito ventral, a veia femoral esquerda foi localizada e dissecada para inserção de uma agulha conectada a um cateter de polietileno (PE 10), que foi usado para a administração de drogas e das soluções necessárias para as avaliações. Após a canulação da veia femoral, 30  $\mu$ l de heparina, diluída em solução salina (0,9%), foi administrada para prevenir a formação de coágulos e evitar a obstrução das cânulas. Em alguns animais a veia femoral direita também foi canulada para receber as infusões necessárias em alguns protocolos. Todos os animais foram submetidos à traqueostomia para facilitar a respiração espontânea. A artéria carótida esquerda foi localizada e cuidadosamente isolada do nervo vago e tecidos adjacentes. Com auxílio de linha de sutura, o fluxo sanguíneo da artéria carótida foi interrompido na

altura de sua extremidade mais distal, enquanto o fluxo em sua extremidade proximal foi temporariamente suprimido pela compressão com uma pinça curva. Utilizando-se uma tesoura oftalmológica, um pequeno corte foi realizado na região medial da porção da artéria carótida clampeada, servindo como via para inserção de um cateter de polietileno (PE 10), devidamente heparinizado, que foi firmemente conectado à artéria e destinou-se à mensuração contínua da pressão arterial média (PAM).

Ao final dos experimentos, todos os animais foram sacrificados através de uma overdose de tiopental (superior a 40 mg/Kg i.v.). Os registros foram obtidos por meio de transdutores de pressão acoplados a um amplificador de sinais (Modelo ML 130, MacLab ADI Instruments, EUA) conectados a um computador Macintosh contendo um software específico de integração (Chart v 4.00, PowerLab/MacLab, ADI Instruments, Austrália), como descrito previamente (CRESTANI *et al.*, 2008).

## **2.9 Avaliação da atividade diurética aguda (dose única)**

A atividade diurética foi determinada segundo protocolo descrito por KAU e colaboradores (1984), com pequenas modificações. Os animais foram mantidos em jejum por aproximadamente 12 horas com acesso livre somente à água. Antes de todos os tratamentos, para impor uniformidade corporal de sal e água (BENJUMEA *et al.*, 2005), todos os animais receberam uma solução de cloreto de sódio 0,9% (5 ml/100g), que foi administrada em 4 doses com intervalo de 15 min. O grupo controle recebeu somente salina, enquanto o grupo controle positivo foi tratado com o diurético furosemida (FURO; 10 mg/Kg). Os animais dos grupos tratados com o extrato bruto das cascas receberam uma única dose de 10, 30, 100 ou 300 mg/Kg cada. Em outro conjunto de experimentos, diferentes grupos de animais foram tratados com a fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* nas doses de 3, 10, 30 ou 100 mg/Kg (dose única). Imediatamente após o tratamento os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais. A urina foi coletada e seu volume registrado em intervalos de 1, 2, 4, 6 e 8 horas após os tratamentos. Ao final da 8ª hora o pH de cada coleta foi mensurado em peagâmetro. A densidade de cada amostra foi avaliada pela diferença do peso dos tubos falcons antes e depois da última coleta.

## **2.10 Protocolos experimentais.**

### **2.10.1 Caracterização do efeito vasodilatador dos extratos bruto das cascas e das folhas e frações de *S. buxifolia*, *in vitro*.**

Após a remoção da aorta torácica e aguardado o período de 60 minutos para a estabilização, a presença ou ausência de endotélio funcional foi confirmada com a adição de acetilcolina (1  $\mu$ M) aos anéis de aorta previamente contraídos pela fenilefrina (1  $\mu$ M), como descrito anteriormente. Esses experimentos foram realizados em anéis de aorta com e sem endotélio funcional. As preparações foram lavadas 3 vezes consecutivas e, após o período de 60 minutos com lavagem a cada 15 minutos, uma segunda resposta à fenilefrina foi obtida. Durante a fase tônica da contração resultante os extratos bruto das folhas ou das cascas da *S. buxifolia*, bem como as frações, DCM, AcOEt e BuOH (das folhas) e DCM, AcOEt e BuOH (das cascas), obtidas desses extratos, foram adicionados às cubas nas concentrações de 3, 5, 10, 30, 50, 100, 300, 500, 1000 e até 3000  $\mu$ g/ml (as maiores concentrações foram adicionadas apenas no caso dos extratos brutos). Ao término deste procedimento as preparações foram lavadas e foi induzida uma nova contração por fenilefrina (1  $\mu$ M), seguida da adição da acetilcolina (1  $\mu$ M), para avaliar se os extratos ou as frações não estavam comprometendo a integridade e funcionalidade das preparações.

### **2.10.2 Avaliação do envolvimento de receptores, muscarínicos (tipo $M_3$ ), bradicininérgicos (tipo $B_2$ ) e histaminérgicos (tipo $H_1$ ) nos efeitos vasorrelaxantes da fração butanólica da casca da *S. buxifolia*.**

Após a confirmação da presença de endotélio e aguardado o período de 60 minutos para a estabilização, para avaliação do envolvimento de receptores, diferentes preparações foram incubadas por um período de 15 minutos com os seguintes antagonistas: atropina (1  $\mu$ M; antagonista de receptores muscarínicos tipo  $M_3$ ), HOE-140 (1  $\mu$ M; antagonista seletivo  $B_2$  da bradicinina), ou pirilamina (10  $\mu$ M, antagonista seletivo de receptores  $H_1$  da histamina), antes da adição de fenilefrina (1  $\mu$ M). Na fase tônica da contração, foram adicionadas as concentrações da fração butanólica das cascas da *S. buxifolia* (3, 5, 10 e 30, g/ml). Os efeitos da fração na ausência e na presença dos antagonistas foram comparados. Para confirmar a eficácia dos antagonistas utilizados, a acetilcolina, a bradicinina e a histamina foram adicionadas às preparações contraídas pela fenilefrina e expostas os seus antagonistas, atropina, HOE-14 e pirilamina, respectivamente, nas mesmas

concentrações citadas anteriormente.

### **2.10.3 Investigação do envolvimento do óxido nítrico, guanilato ciclase e da prostaciclina, no efeito vasorrelaxante da fração butanólica das cascas da *S. buxifolia*.**

Após a confirmação de endotélio funcional e um período de 60 minutos para restabilização, com troca de líquido a cada 15 minutos, os anéis de aorta foram incubados com L-NAME (100  $\mu$ M), inibidor não seletivo das enzimas óxido nítrico sintase, OEQ (10  $\mu$ M), inibidor seletivo da enzima guanilato ciclase solúvel, ou indometacina (10  $\mu$ M), inibidor da síntese de prostanóides, durante 15 minutos. Na presença dessas substâncias, foi induzida uma nova contração por fenilefrina e, na fase tônica dessa contração foi adicionada a fração butanólica das cascas da *S. buxifolia* (3, 5, 10 e 30 g/ml). Os efeitos da fração na presença e na ausência destas drogas foram comparados.

### **2.10.4 Avaliação do efeito da fração butanólica das cascas da *S. buxifolia* sobre a contração induzida pela fenilefrina**

Esses experimentos foram realizados em anéis aórticos sem endotélio funcional. Após a confirmação da ausência de endotélio funcional, aguardou-se o período de 60 minutos para a estabilização das preparações. As concentrações de 10, 30 e 100  $\mu$ g/ml da fração butanólica das cascas da *S. buxifolia* foram adicionadas às preparações e mantidas por 15 minutos. Após esse período, sem lavar as preparações, foi construída uma curva concentração resposta (CCR) à fenilefrina, a qual foi adicionada de forma cumulativa (1 nM-30  $\mu$ M) às cubas. Como controle foi construída uma CCR cumulativa com fenilefrina na ausência da fração butanólica.

### **2.10.5 Avaliação do envolvimento do cálcio extra e intracelular nos efeitos dilatadores da fração butanólica de *S. buxifolia* na aorta de ratos**

Para avaliar o envolvimento do cálcio no relaxamento induzido pela fração butanólica foram realizados dois conjuntos diferentes de experimentos, ambos em preparações sem endotélio funcional, a fim de evitar que mediadores endoteliais interferissem na resposta de relaxamento ou contração do tecido.

No primeiro protocolo, após a confirmação da ausência de endotélio funcional

o líquido nutritivo de Krebs' foi trocado por uma solução nutritiva de Krebs' despolarizante livre de cálcio (60 nM de KCl). Foi aguardado um período de 60 min para a estabilização das preparações. Foram incubadas durante 15 min diferentes concentrações da fração butanólica (10, 30 ou 100 µg/ml) e, após este período, foi construída uma CCR para solução de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>, 1 nM-10 mM) em cada cuba. Preparações nas quais a fração butanólica não foi adicionada foram utilizadas como controle.

Para avaliar a mobilização do cálcio intracelular no efeito vasorrelaxante da fração butanólica foi seguido o seguinte protocolo: após a confirmação da ausência de endotélio e aguardado o período de 60 minutos para a estabilização, as preparações foram lavadas e o líquido nutritivo de Krebs substituído por líquido nutritivo livre de cálcio. Após 15 min em líquido nutritivo sem cálcio (4-5 trocas foram realizadas no primeiro minuto, para garantir remoção completa do cálcio nas cubas), diferentes anéis de aorta foram expostos à fração butanólica das cascas da *S. buxifolia* na concentração de 10, 30 ou 100 µg/ml. Após 15 minutos na presença da fração, uma nova contração foi induzida pela fenilefrina (1 µM). Preparações submetidas ao mesmo protocolo em líquido nutritivo sem cálcio, porém sem exposição à fração butanólica, foram utilizadas como controle nesses experimentos.

#### **2.10.6 Avaliação do envolvimento dos canais de K<sup>+</sup> no efeito vasorrelaxante da fração butanólica das cascas da *S. buxifolia* *in vitro*.**

A influência de bloqueadores de potássio sobre o efeito vasodilatador da fração butanólica do extrato das cascas da *S. buxifolia* foi avaliada em anéis de aorta com e sem endotélio funcional. Em diferentes preparações com endotélio (após o intervalo para restabilização), foi incubada glibenclamida (GLI, 10 µM), bloqueador seletivo de canais de potássio sensíveis ao ATP, ou tetraetilamônio (TEA, 10 mM), bloqueador não-seletivo de canais de K<sup>+</sup>. Na presença destas substâncias foi induzida uma nova contração por fenilefrina e na fase tônica desta contração, adicionou-se a fração butanólica (3, 5, 10 e 30 µg/ml).

O mesmo protocolo experimental foi seguido em anéis de aorta sem endotélio funcional. Essas preparações foram incubadas com 4-aminopiridina (4-AP, 1 mM), um bloqueador de canais de K<sup>+</sup> ativados por voltagem, e iberitoxina (IbTX, 100 nM), bloqueador altamente seletivo para canais de K<sup>+</sup> ativados por cálcio do tipo de alta condutância, além do TEA (10 mM) e da GLI (10 µM), citados anteriormente. Na

presença desses inibidores foi induzida uma nova contração por fenilefrina (1  $\mu$ M) e na fase tônica da contração, foi adicionada a fração butanólica de *S. buxifolia* (3, 5, 10 e 30  $\mu$ g/ml), como descrito nos demais protocolos.

Os efeitos da fração butanólica da casca da *S. buxifolia* na presença e na ausência dos inibidores de canais de K<sup>+</sup>, tanto nas preparações com como sem endotélio funcional, foram comparados entre si.

#### **2.10.7 Avaliação da atividade diurética aguda (dose única) em ratos normotensos.**

Os animais foram mantidos com acesso livre somente à água por aproximadamente 12 horas. Após este período todos os ratos receberam a sobrecarga com solução salina (5% do peso corporal) por via oral. Os animais foram separados em diferentes grupos: grupo controle (tratado somente com água destilada, 5 ml/kg); grupo controle positivo tratado com o diurético furosemida (Furo; 10 mg/Kg); grupo tratado com o extrato bruto das cascas (10, 30, 100 e 300 mg/Kg) e o grupo que recebeu a fração butanólica (3, 10, 30 e 100 mg/Kg). Após o tratamento os animais foram isolados em gaiolas metabólicas individuais e o volume de urina foi coletado nos tempos de 1, 2, 4, 6 e 8 horas. A excreção cumulativa da urina foi calculada em relação ao peso corporal e expressa como ml/100g de peso corporal. Parâmetros como o pH e a densidade também foram avaliados.

#### **2.10.8 Investigação do efeito da administração oral da fração butanólica da *S. buxifolia* na pressão arterial média (PAM) de ratos normotensos**

Nestes experimentos uma única dose da fração butanólica (10 mg/Kg, v.o.), ou o veículo (controle) foram administrados aos animais, 90 min, 3 e 6 horas antes da mensuração da PAM. A cirurgia descrita no item 3.5 foi iniciada 30 min antes do tempo desejado. Um período de 15 min foi aguardado para a estabilização da pressão arterial, a qual foi mensurada por mais 30 minutos.

#### **2.10.9 Avaliação do efeito da fração butanólica sobre a PAM de ratos durante a infusão contínua de fenilefrina**

Após a preparação cirúrgica do animal uma das veias femorais foi conectada a uma bomba de infusão contínua (modelo EFF 311, Insight<sup>®</sup>, Ribeirão Preto, SP). Após o período de estabilização da PAM, os animais receberam infusão contínua de

fenilefrina (20 nmol/kg/min) por 60 minutos. Durante a infusão de fenilefrina, os efeitos da fração butanólica de *S. buxifolia* sobre a PAM foram avaliados, através da administração intravenosa das doses de 1, 3 e 10 mg/kg através da outra veia femoral, com intervalo de 10 a 15 minutos entre cada dose.

#### **2.10.10 Efeito da fração butanólica na PAM de ratos durante a infusão contínua de L-NAME**

Os animais foram preparados de acordo com os procedimentos descritos acima. Após o período de estabilização da PAM os animais foram infundidos continuamente com L-NAME (7 mg/kg/min). Após o período de estabilização de aproximadamente 30 minutos de infusão os animais receberam, pela outra veia femoral, doses de 1, 3 e 10 mg/kg da fração butanólica das cascas da *S. buxifolia*, com intervalo de 10 a 15 minutos entre cada doses. O efeito vasodilatador da acetilcolina, administrada na dose de 10 nmol/kg, foi utilizado como controle positivo.

#### **2.10.11 Avaliação da participação da enzima guanilato ciclase solúvel sobre a ação da fração butanólica na PAM de ratos anestesiados**

Nesses experimentos, durante a infusão com fenilefrina (20 nmol/kg/min) descrita no item 3.6.9 os animais receberam ODQ na dose de 2 mg/kg (i.v., em *bolus*). Um intervalo de 10-15 minutos foi respeitado para a estabilização da PAM e, em seguida, foi a fração butanólica das cascas da *S. buxifolia* foi administrada nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg (i.v.) com intervalos de 10 a 15 minutos entre as administrações.

#### **2.10.12 Avaliação dos efeitos da fração butanólica da *S. buxifolia* sobre a PAM de ratos espontaneamente hipertensos (SHR).**

Após os procedimentos cirúrgicos descritos no item 3.5 e aguardado o período de 30 minutos para a estabilização da PAM, animais SHR receberam as doses de 1, 3 e 10 mg/Kg (i.v.) da fração butanólica da casca da *S. buxifolia*. O efeito hipotensor da ACh (10 nmol/kg) foi utilizado como controle positivo nesses experimentos.

### **2.11 Análises dos resultados e testes estatísticos**

Os gráficos foram elaborados usando-se o programa GraphPad Prism versão

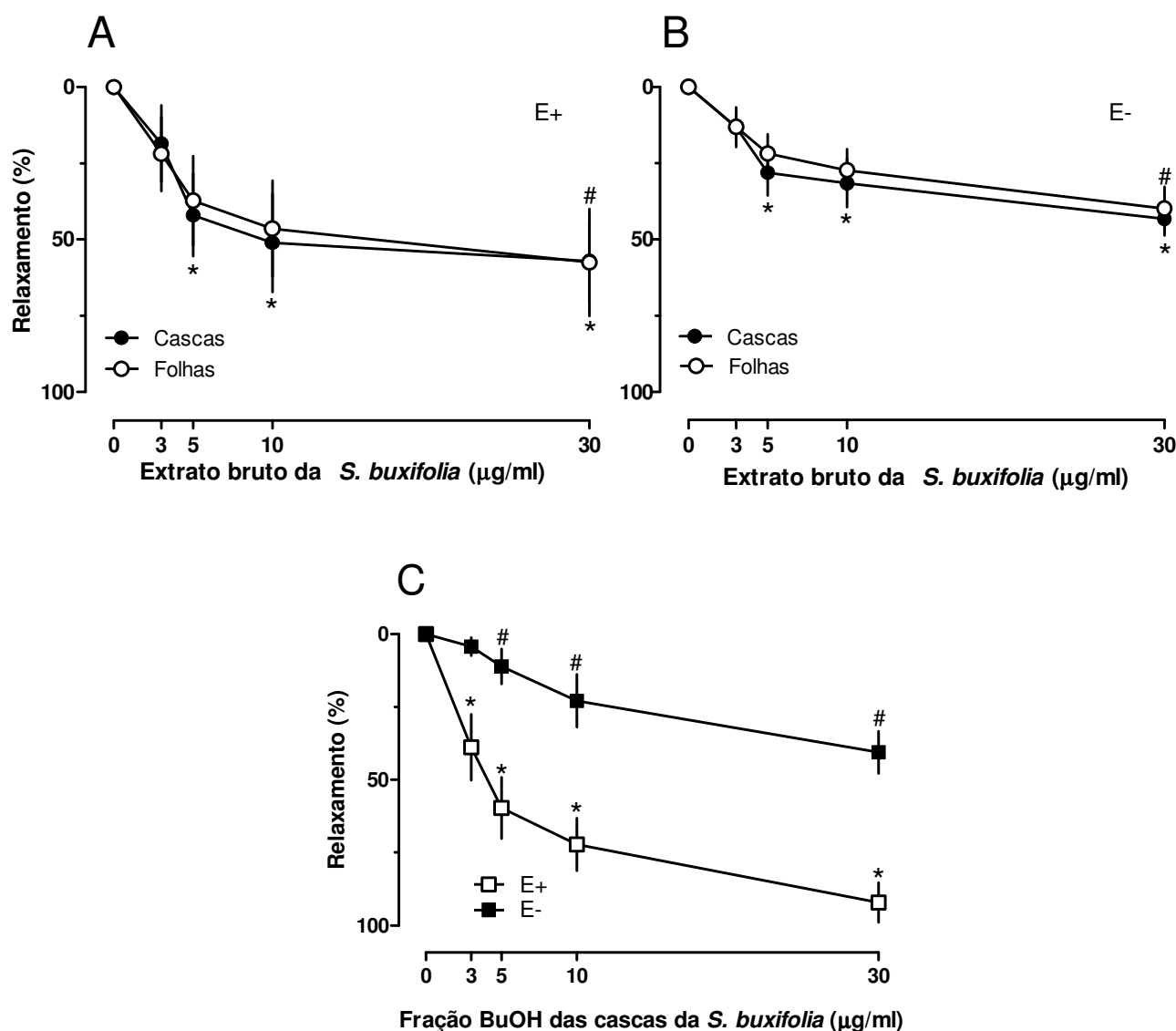
5.01 para Windows (San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Para a análise estatística, foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste *t* de Bonferroni ou o teste *t* de Student, para amostras não pareadas. Foram considerados estatisticamente significantes os testes cujo valor de *p* foi menor que 0,05. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão médio de no mínimo 6 experimentos.

### **3 RESULTADOS**

#### **3.1 Efeito vasorrelaxante do extrato bruto da casca e das folhas da *S. buxifolia* e de suas respectivas frações em anéis de aorta de rato**

Tanto o extrato bruto das cascas como o extrato bruto das folhas da *S. buxifolia* foram capazes de promover relaxamento em anéis de aorta com e sem endotélio funcional, previamente contraído por fenilefrina (1  $\mu$ M). O relaxamento máximo promovido pelo extrato bruto das cascas da *S. buxifolia* em preparações com e sem endotélio funcional foi de  $57,1 \pm 12,9\%$  e  $43,3 \pm 5,5\%$ , respectivamente, para a concentração de 30  $\mu$ g/ml. Por sua vez, o relaxamento vascular máximo promovido pelo extrato bruto das folhas (30  $\mu$ g/ml) foi de  $57,2 \pm 17,6\%$  e  $39,9 \pm 7,1\%$ , em anéis de aorta previamente contraídos por fenilefrina com e sem endotélio, respectivamente (Fig. 2, Painéis A e B). Não existiram diferenças estatisticamente significativas entre o relaxamento obtido pelos diferentes extratos ou entre as preparações com e sem endotélio funcional. Todas as frações testadas promoveram relaxamento vascular tanto em preparações com como sem endotélio funcional. No entanto, a fração butanólica das cascas (Fig. 2, Painel C) foi capaz de promover relaxamento superior a 90% em preparações com endotélio funcional já na concentração de 30  $\mu$ g/ml (Tabela 1). A fração butanólica das cascas da *S. buxifolia*, apresentou maior atividade vasorrelaxante em anéis de aorta com endotélio funcional, sendo esta a utilizada em todos os demais protocolos experimentais deste estudo. A resposta dos anéis de aorta com endotélio funcional ao relaxamento promovido pela ACh, não foi alterada pela adição da fração BuOH (resultado não mostrado), sugerindo que não houve comprometimento da integridade vascular após a exposição dos anéis à fração BuOH.





**Figura 2: Relaxamento dependente e independente de endotélio dos extratos brutos e da fração butanólica das cascas da *S. buxifolia*.** A e B mostram o efeito vasorrelaxante do extrato bruto das cascas e das folhas da *S. buxifolia*, respectivamente, em preparações com e sem endotélio. O efeito vasodilatador induzido pela fração butanólica está representado em C. E<sup>+</sup> representa anéis de aorta com endotélio funcional. E<sup>-</sup> representa anéis de aorta sem endotélio funcional. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias de 6 a 8 experimentos. Comparações estatísticas foram realizadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguida de Bonferroni para correção. # e \* indicam um valor de  $p < 0,05$  para anéis de aorta com e sem endotélio respectivamente, quando comparadas com a contração máxima obtida antes da adição da fração BuOH nas preparações.

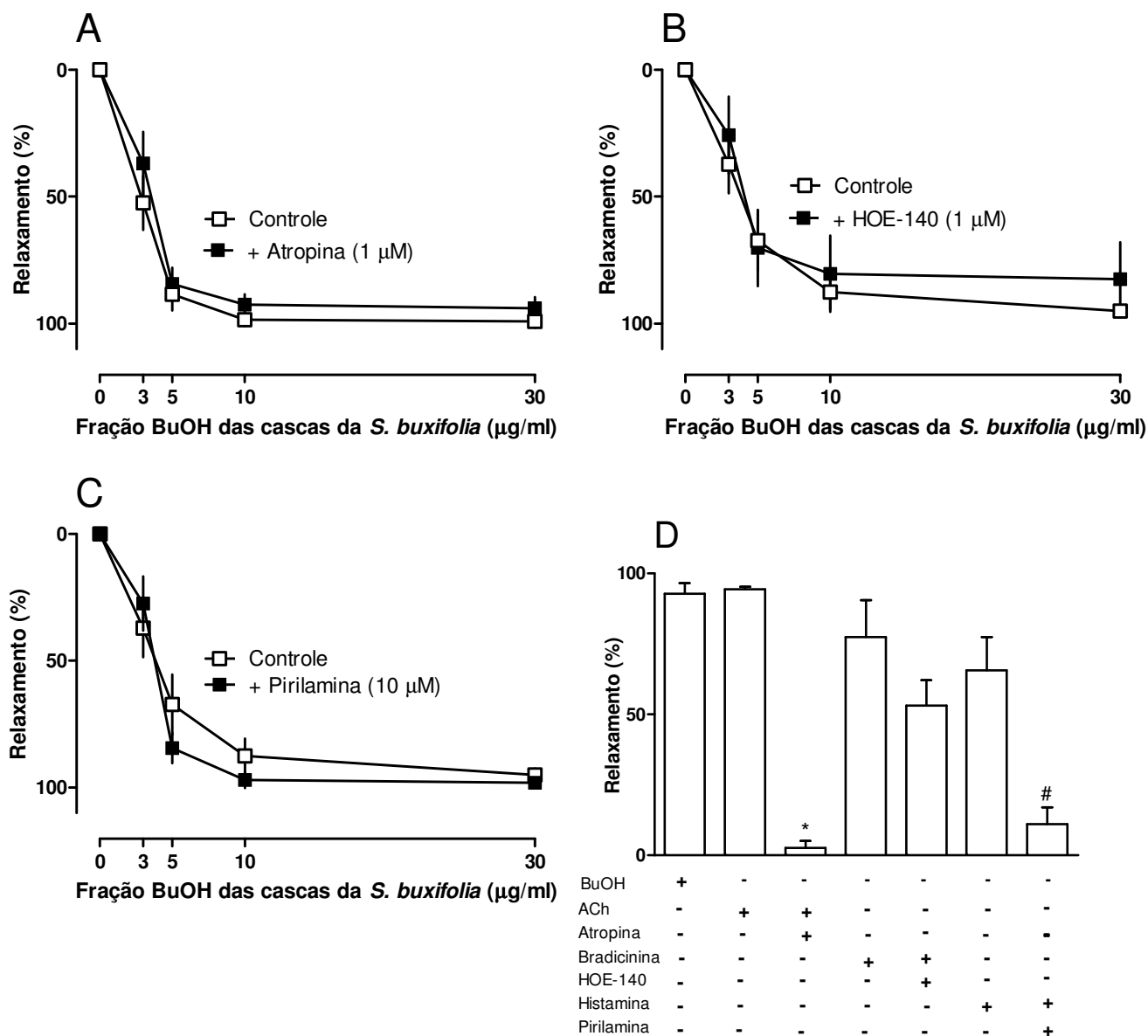
**Tabela 1:** Efeito vasorrelaxante das frações obtidas a partir do extrato bruto das cascas e das folhas da *Scutia buxifolia* em anéis de aorta isolada de rato, na presença (E<sup>+</sup>) e ausência (E<sup>-</sup>) de endotélio funcional.

Frações [ $\mu\text{g/ml}$ ]	3	5	10	30	50
<i>Cascas</i>					
AcOEt E+	10.9 $\pm$ 5.3 (9)	22.6 $\pm$ 7.4 (9)	*34.9 $\pm$ 11.1 (9)	***65.8 $\pm$ 6.2 (9)	***73.8 $\pm$ 4.9 (9)
AcOEt E-	*27.2 $\pm$ 8.9 (11)	**42.7 $\pm$ 10.3(11)	**44.3 $\pm$ 9.6 (11)	***56.2 $\pm$ 8 (11)	***58 $\pm$ 7.7 (11)
BuOH E+	*38.8 $\pm$ 11.3 (9)	***59.7 $\pm$ 10.5 (9)	***72.1 $\pm$ 9.0 (9)	***92.1 $\pm$ 6.7 (9)	***94.2 $\pm$ 7.3 (9)
BuOH E-	4.3 $\pm$ 3.1 (7)	*11.1 $\pm$ 6.0 (7)	**22.9 $\pm$ 9.0 (7)	***40.6 $\pm$ 7.2 (7)	***44.3 $\pm$ 7.8 (7)
DCM E+	**29.5 $\pm$ 10 (9)	***47.1 $\pm$ 11.2 (9)	***63.7 $\pm$ 10.6 (9)	***76.1 $\pm$ 7.7 (9)	***85.2 $\pm$ 4.3 (9)
DCM E-	14.2 $\pm$ 5.9 (12)	18.2 $\pm$ 6.5 (12)	*23.7 $\pm$ 7.4 (12)	***43.3 $\pm$ 7 (12)	***55 $\pm$ 7.9 (12)
<i>Folhas</i>					
AcOEt E+	16.2 $\pm$ 9.5 (11)	*34.9 $\pm$ 11.9 (11)	43.9 $\pm$ 10.4 (11)	***71.1 $\pm$ 7(11)	***83.9 $\pm$ 4(11)
AcOEt E-	7.5 $\pm$ 6.4 (11)	12.2 $\pm$ 7.5 (11)	17.0 $\pm$ 7.7 (11)	*32.5 $\pm$ 8.9 (11)	**42.1 $\pm$ 9.7(11)
BuOH E+	20.7 $\pm$ 13.3 (8)	*32.9 $\pm$ 13.7 (8)	***66.6 $\pm$ 13.5 (8)	***89.6 $\pm$ 6.8 (8)	***91.4 $\pm$ 5.7 (8)
BuOH E-	18.5 $\pm$ 9.4 (10)	27.7 $\pm$ 10.6 (10)	33.8 $\pm$ 10.8 (10)	***54.1 $\pm$ 9(10)	***62.3 $\pm$ 7.7 (0)
DCM E+	2.3 $\pm$ 1.8 (6)	3.6 $\pm$ 2.3 (6)	7.7 $\pm$ 3.4 (6)	8.2 $\pm$ 3.7 (6)	9.9 $\pm$ 3.4 (6)
DCM E-	0.1 $\pm$ 0.0 (8)	0.2 $\pm$ 0.2 (7)	0.0 $\pm$ 2.8 (10)	0.0 $\pm$ 2.8 (10)	3.6 $\pm$ 1.2 (6)

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média do percentual de relaxamento de cada fração, em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina. O número de experimentos para cada grupo  $n$  está demonstrado em parênteses. E+ e E- indicam a presença e a ausência de endotélio funcional, respectivamente. AcOEt: fração acetato de etila; BuOH: fração butanólica; DCM: fração diclorometano. Análises estatísticas foram realizadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguida de Bonferroni. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparados com a contração máxima obtida antes da adição de cada fração.

### **3.2 Efeito promovido pela adição de antagonistas dos receptores muscarínicos, bradicininérgicos e histaminérgicos sobre o relaxamento vascular induzido pela fração butanólica das cascas BuOH da *S. buxifolia*.**

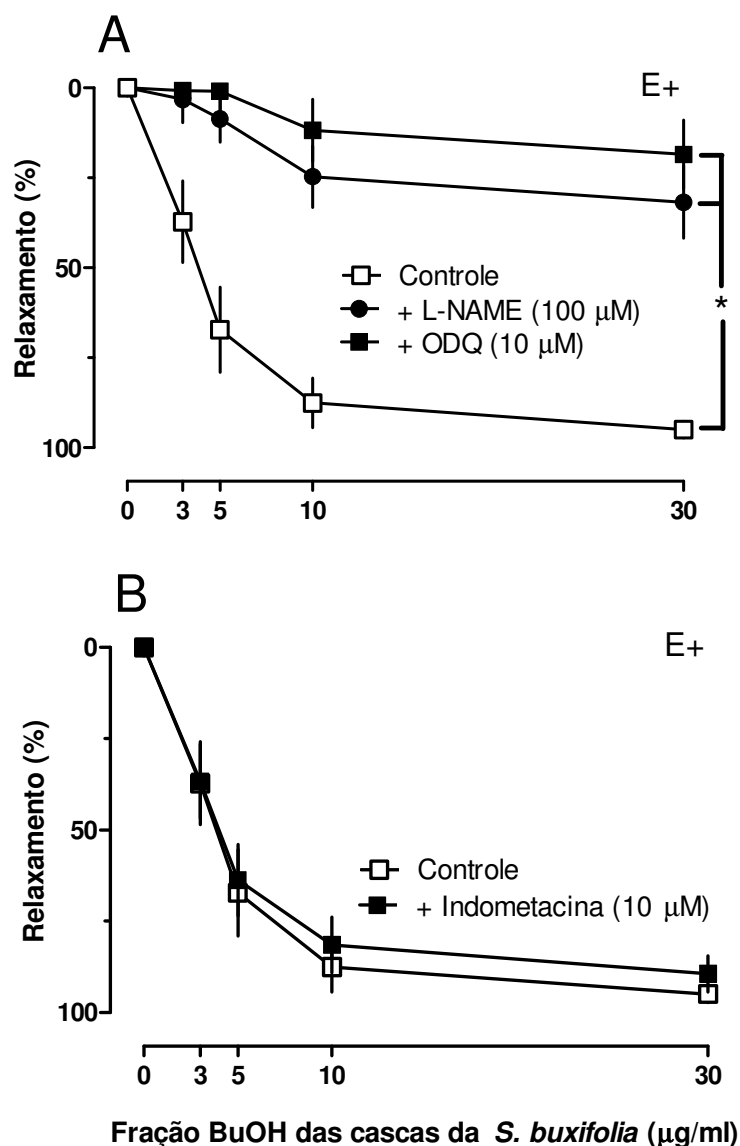
Na presença de endotélio a incubação prévia de atropina (1  $\mu$ M), antagonista de receptores muscarínicos, (Fig. 3, Painel A), HOE-140 (1  $\mu$ M), antagonista de receptores B2 da bradicinina (Fig. 3, Painel B), ou pirilamina (10  $\mu$ M), antagonista de receptores H<sub>1</sub> da histamina (Fig. 3, Painel C), em concentrações suficientes para reduzir o relaxamento induzido pela ACh, bradicinina ou histamina, respectivamente (Fig. 3, Painel D), não modificou o efeito vasorrelaxante promovido pela fração BuOH em anéis de aorta previamente contraídos por fenilefrina.



**Figura 3: Ausência de envolvimento de receptores muscarínicos, bradikinérgicos e histaminérgicos no relaxamento induzido pela fração butanólica das cascas da *S. buxifolia* em anéis de aorta de rato com endotélio funcional.** A atropina antagonista de receptor muscarínico (Painel A), do HOE-140, antagonista de receptor da bradicinina (Painel B), e pirilamina, antagonista de receptor da histamina (Painel C), foram incubados 15 minutos antes da adição da fração BuOH das cascas em anéis de aorta pré-contráidos por fenilefrina. O Painel D mostra o relaxamento vascular promovido pela acetilcolina, bradicinina e histamina na presença de seus respectivos antagonistas. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias de 6 a 12 experimentos. Análises estatísticas foram realizadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguida de Bonferroni. Para o painel D teste *t* de Student  $n=6$ , para comparação entre os controles; \*  $p < 0,05$ ; #  $p < 0,05$ .

### **3.3 Envolvimento do óxido nítrico e guanilato ciclase solúvel mas não do derivado do ácido araquidônico no vasorrelaxamento promovido pela fração BuOH das cascas da *S. buxifolia***

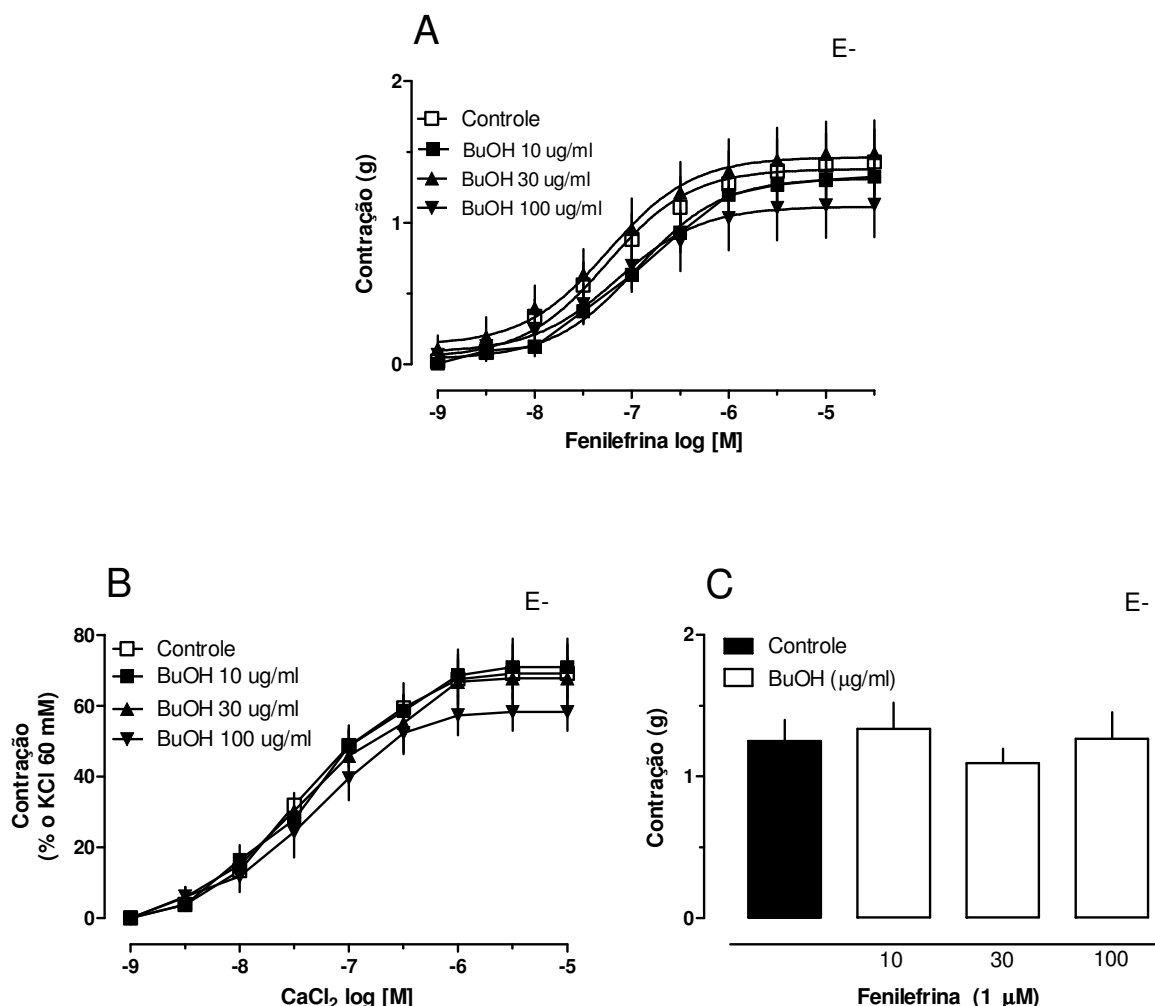
A fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* (3, 5, 10 e 30 µg/ml) promoveu relaxamento vascular de forma dependente da concentração em anéis de aorta com endotélio funcional previamente contraídos por fenilefrina. Este efeito foi significativamente inibido pela adição prévia do L-NAME, inibidor inespecífico da enzima óxido nítrico sintase (100 µM), assim como também pelo ODQ, inibidor seletivo da enzima guanilato ciclase solúvel (10 µM), (Fig. 4, Painel A). A adição de indometacina (10 µM), inibidor da síntese de prostanóides não alterou o relaxamento promovido pela fração BuOH das cascas (Fig. 4, Painel B).



**Figura 4: Inibição do efeito vasorrelaxante da fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* pelos inibidores da óxido nítrico sintase e da guanilato ciclase, mas não pelo inibidor da ciclooxigenase.** O inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase L-NAME, ou o inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel ODQ (Painel , A), ou o inibidor da ciclooxigenase, indometacina (Painel, B), foram incubados por 15 minutos antes da contração induzida pela adição da fenilefrina. A fração BuOH foi adicionada às preparações expostas ou não (controles) aos inibidores. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias de 6 a 12 experimentos. As análises estatísticas foram realizadas usando-se ANOVA de uma via seguida de Bonferroni.\*  $p < 0,05$  para todos os pontos quando comparados com o grupo controle.

### **3.4 Ausência de efeito da fração BuOH da casca da *S. buxifolia* sobre a contração induzida pela fenilefrina e pelo cálcio**

A fração butanólica das cascas da *S. buxifolia* nas concentrações de 10, 30 ou 100 µg/ml, não modificou a contração máxima promovida pela adição cumulativa da fenilefrina (1 nM-30 µM) (Fig. 5, painel A). Do mesmo modo a fração butanólica não reduziu a contração máxima promovida pela adição cumulativa de CaCl<sub>2</sub> (1 nM-10 mM) e não alterou a contração máxima induzida pela fenilefrina (1 µM) em preparações de aorta sem endotélio mantidas em líquido nutritivo desprovido de cálcio (Fig. 5, painéis B e C).

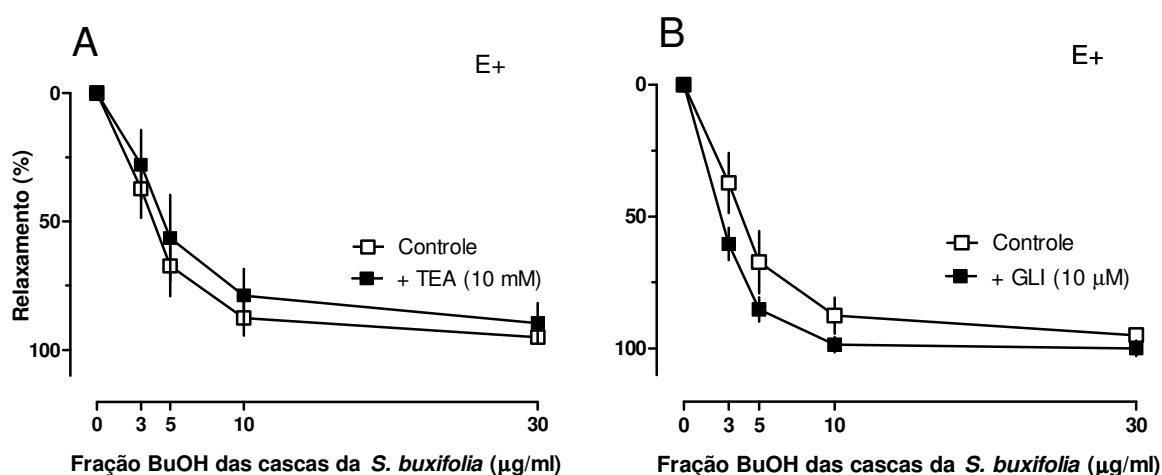


**Figura 5: Ausência de efeito da fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* sobre a contração induzida pela fenilefrina e pelo cálcio.** Painei A: curva concentração resposta (CCR) induzidas pela adição cumulativa de fenilefrina na ausência e presença da fração BuOH (15 min) Painei B: CCR promovida pela adição cumulativa de CaCl<sub>2</sub> na presença e ausência da fração BuOH em preparações mantidas em líquido nutritivo despolarizante e livre de cálcio. Painei C: efeito da fenilefrina em preparações livres de cálcio, na presença e ausência da fração BuOH. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 8 a 10 experimentos. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos. (ANOVA de uma via seguida de Bonferroni)

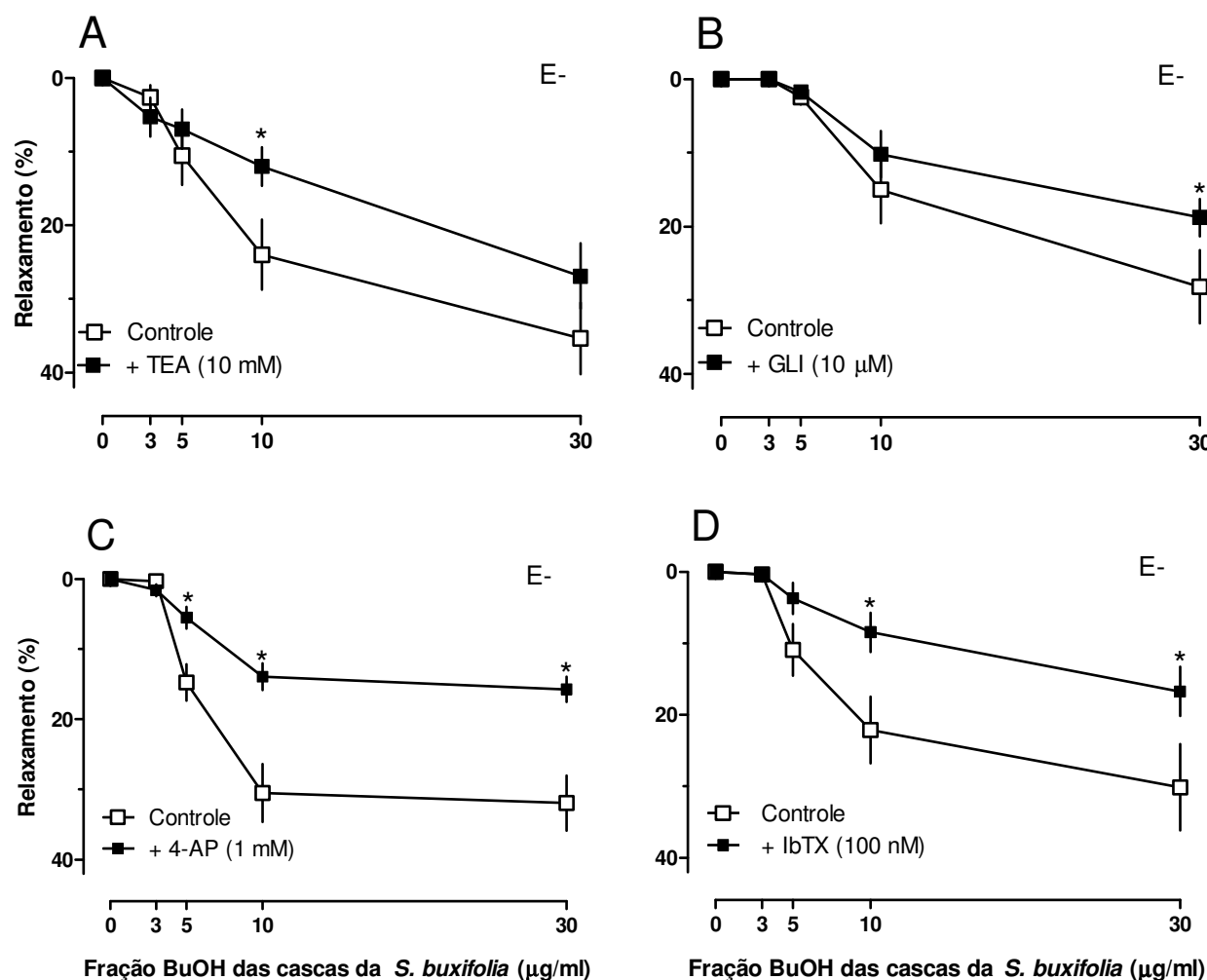


### 3.5 Ação de bloqueadores de canais de potássio sobre o relaxamento induzido pela fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* em anéis de aorta de rato sem endotélio funcional

O efeito vasorrelaxante da fração BuOH em anéis de aorta com endotélio não foi modificado pela adição do bloqueador não seletivo de canais de  $K^+$  tetraetilamônio (TEA, 10 mM) e tampouco pelo bloqueador seletivo de canais de  $K^+$  sensíveis ao trifosfato de adenosina ( $K_{ATP}$ ) glibenclamida (GLI, 10  $\mu$ M) (Fig. 6, Painéis, A e B respectivamente). Entretanto, em anéis de aorta sem endotélio, pré-contráídos por fenilefrina, o relaxamento vascular promovido pela fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* significativamente reduzido pela adição do TEA e da GLI, bem como pela 4-aminopiridina (4-AP, 1 mM), bloqueador seletivo de canais de potássio ativados por voltagem e pela iberiotoxina (IbTX, 100 nM), bloqueador altamente seletivo dos canais de  $K^+$  sensíveis ao cálcio de alta condutância (Fig. 7, Painéis A, B, C e D respectivamente).



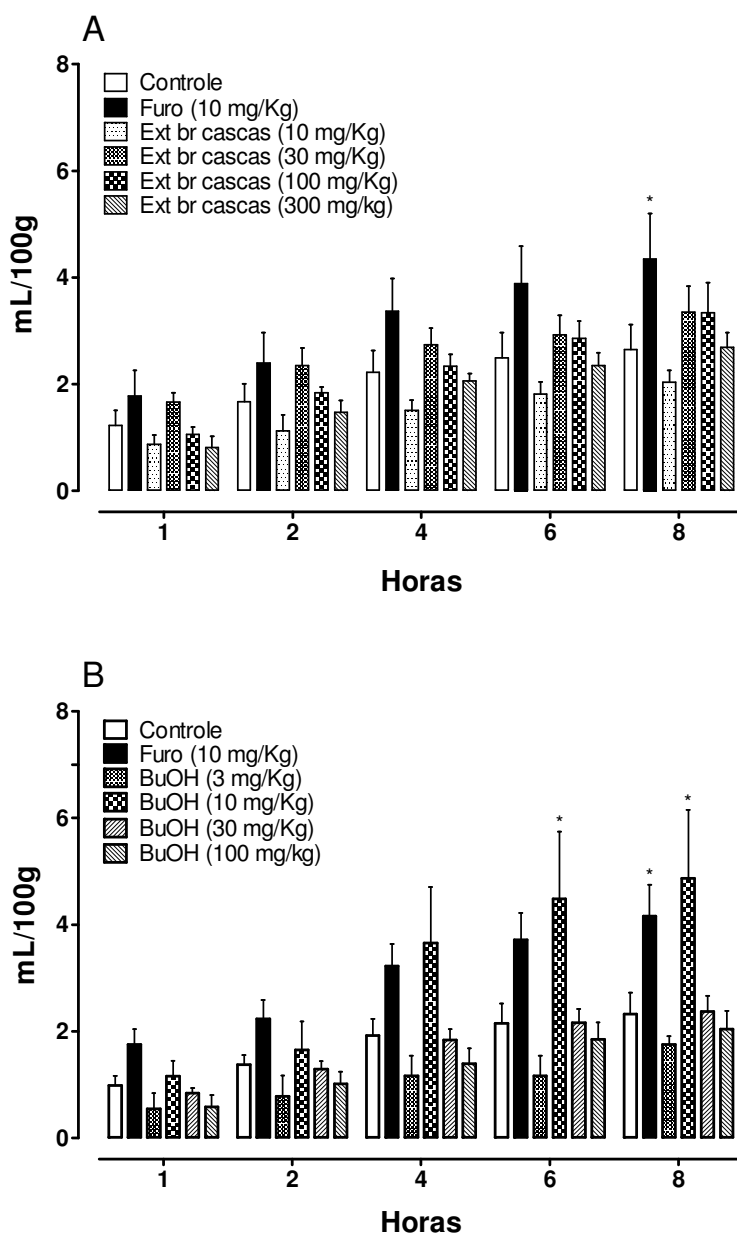
**Figura 6: Ausência de influência de bloqueadores de canais de  $K^+$  sobre o efeito vasorrelaxante da fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* em anéis de aorta de rato com endotélio funcional.** O bloqueador não seletivo de canais de potássio tetraetilamônio (TEA; Painel A) e o bloqueador seletivo de canais de potássio sensíveis ao ATP glibenclamida (GLI; Painel B), foram adicionados às cubas 15 min antes da adição da fração BuOH em anéis de aorta contraídos por fenilefrina. O grupo controle mostra os resultados obtidos em aortas que não foram expostas aos bloqueadores. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média de 9 a 12 experimentos. As análises estatísticas foram realizadas usando-se ANOVA de uma via seguida de Bonferroni. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre grupos.



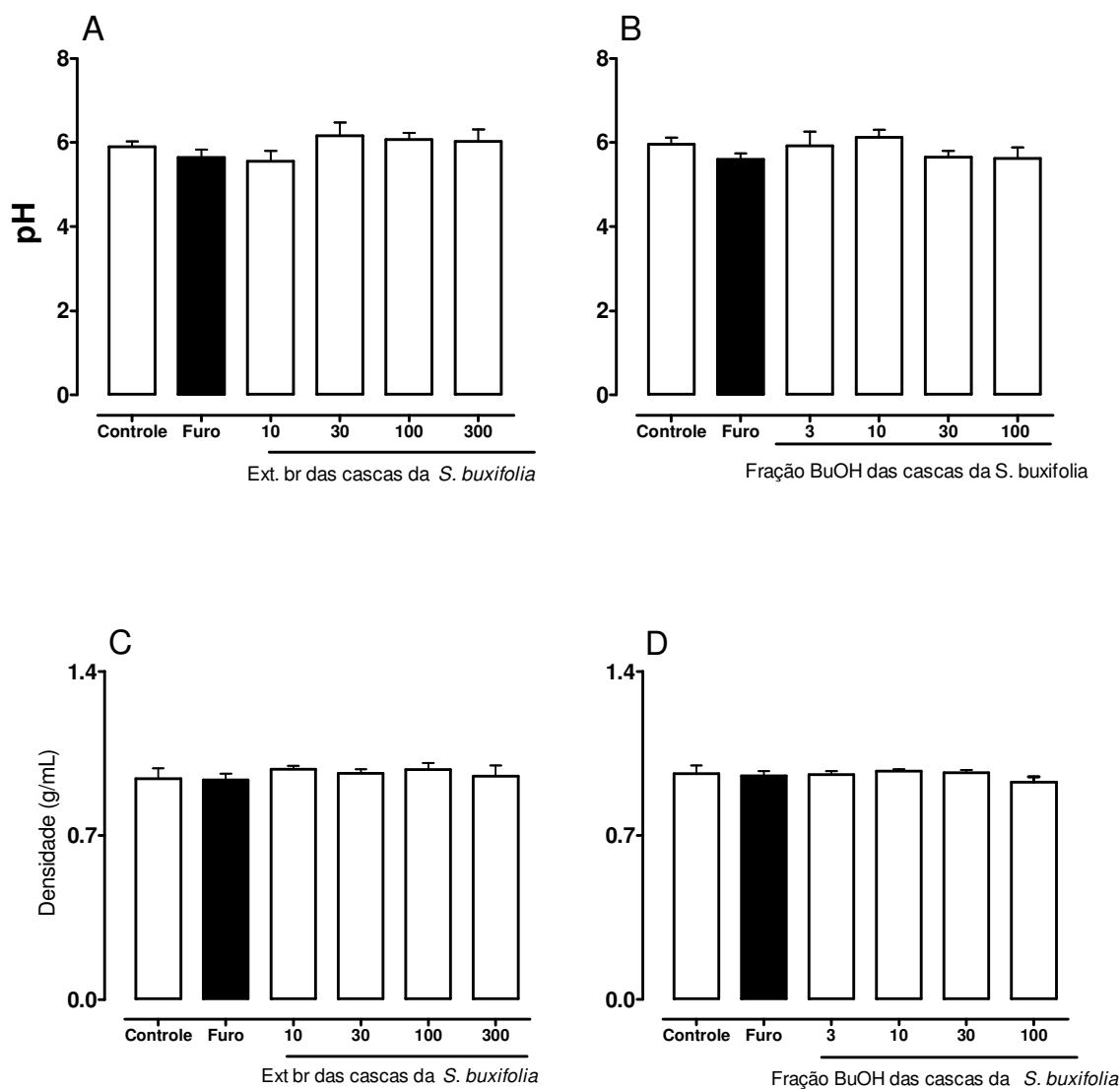
**Figura 7: Ação dos bloqueadores de canais de  $K^+$  sobre o relaxamento promovido pela fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* em anéis de aorta de rato sem endotélio funcional.** O bloqueador não seletivo de canal de  $K^+$  tetraetilamônio (TEA; Painel A), e os bloqueadores seletivos, glibenclamida, bloqueador seletivo de canal de  $K^+$  sensível ao ATP (GLI; Painel B), 4-aminopiridina, bloqueador seletivo de canal de  $K^+$  ativados por voltagem (4-AP; Painel C) e iberiotoxina (IbTX; Painel D), bloqueador seletivo de canal de  $K^+$  ativados por cálcio de alta condutância, foram adicionados às preparações 15 min antes da adição da fração BuOH em anéis de aorta contraídos por fenilefrina. Os grupos controle mostram os resultados obtidos em anéis de aorta que não foram expostos aos bloqueadores. Os resultados estão expressos  $\pm$  erro padrão da média de 8 a 12 experimentos. \*  $p < 0,05$  quando comparados aos seus respectivos controles (ANOVA de uma via seguida de Bonferroni).

### **3.6 Efeito diurético do extrato bruto e da BuOH das cascas da *Scutia buxifolia* em ratos *Wistar* normotensos.**

Nesses experimentos os animais foram tratados pela via oral com o extrato bruto ou a fração BuOH das cascas da *S. buxifolia*. O volume de urina excretado o pH e a densidade foram avaliados. A figura 8 (Painel A) mostra um discreto aumento no volume de urina excretado (mL/100g) após o tratamento com o extrato bruto das cascas da *S. buxifolia* nas doses de 30 e 100 mg/Kg. No painel B, os dados são referentes ao aumento no volume de urina excretado por animais quando tratados com a fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* na dose de 10 mg/Kg, sendo este significativo a partir da 6 hora quando comparado aos animais controle (veículo). Parâmetros como pH (Fig. 9, Painéis A e B) e densidade (Fig. 9, Painéis C e D) foram avaliados mas não apresentaram diferenças significativas quando comparados ao grupo controle, tanto em animais tratados com o extrato bruto das cascas como naqueles tratados com a fração BuOH das cascas. A tabela 2 mostra o volume urinário excretado pelos animais controle (salina), tratados com furosemida (controle positivo) e tratados com a fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* na 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> hora.



**Figura 8: Aumento do volume urinário excretado promovido pelo tratamento oral com o extrato bruto e fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* em animais normotensos.** O resultado no Painei A mostra um discreto aumento de volume de urina excretada (não significativo de acordo com o teste estatístico realizado) nos animais tratados via oral com o extrato bruto das cascas, quando comparado com animais tratados com a furosemida (Furo). O painei B, representa o efeito diurético promovido pelo tratamento com a fração BuOH das cascas da *S. buxifolia*. Os resultados estão expressos  $\pm$  erro padrão da média. \*  $p < 0.05$ , quando comparados ao grupo controle (veículo) (ANOVA de Duas Vias, seguida de Bonferroni),



**Figura 9: O tratamento oral com o extrato bruto ou a fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* não alterou o pH e densidade da urina dos animais.** Painéis A, B, C e D representam o pH e densidade. Os resultados estão expressos  $\pm$  erro padrão da média. Não encontramos diferenças entre os grupos. (ANOVA de Duas Vias, seguida de Bonferroni). Legenda: Furo (furosemina); controle (veículo); Ext. br. (extrato bruto).

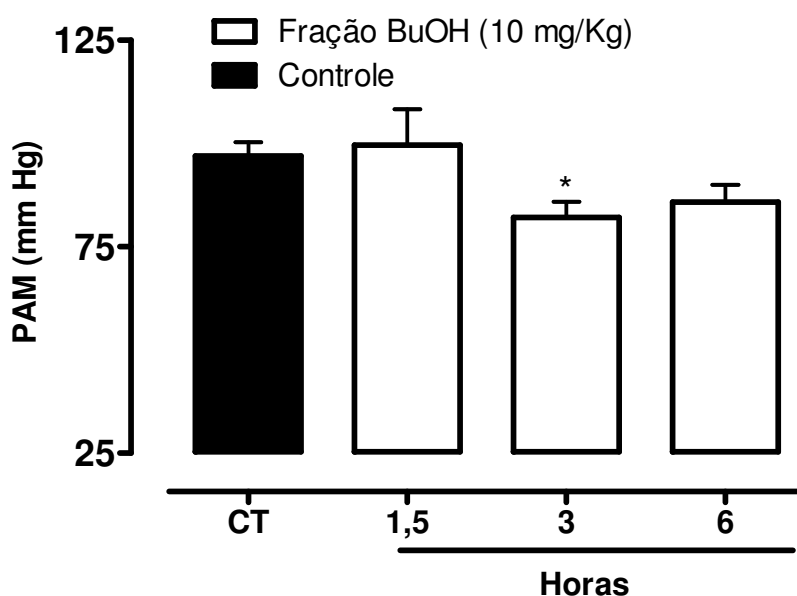
**Tabela 2:** Aumento do volume de urina excretada na 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> horas após a administração oral da fração BuOH das cascas da *S. buxifolia*.

Grupo	n	Volume urina (mL/100g)	
		6h	8h
Controle	8	2.5 ± 0.3	2.3 ± 0.4
Furo (10 mg/Kg)	8	3.7 ± 0.4	4.1 ± 0.5
BuOH (3 mg/Kg)	8	1.1 ± 0.3	1.7 ± 0.1
BuOH (10 mg/Kg)	8	*4.4 ± 1.2	**4.8 ± 1.2
BuOH (30 mg/Kg)	8	2.1 ± 0.2	2.3 ± 0.2
BuOH (100 mg/Kg)	8	1.8 ± 0.3	2.0 ± 0.3

Os resultados mostram aumento do volume de excreção urinária após a administração oral da fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* em ratos normotensos. Os resultados estão expressos como a média ± o erro padrão da média; *n* = número de animais por grupo. \* *p* < 0.05; \*\* *p* < 0.01, quando comparados ao controle. (ANOVA de Duas Vias, seguida de Bonferroni). Legenda: Furo (furosemida).

### 3.7 Efeito hipotensor promovido pela fração BuOH das cascas da *Scutia buxifolia* (via oral) em ratos normotensos anestesiados

O tratamento pela via oral com a dose de maior atividade diurética (10 mg/Kg) da fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* em diferentes tempos, promoveu efeito hipotensor significativo de aproximadamente 15 mm Hg na 3ª hora, e de 11,2 mm Hg na 6ª hora, quando comparado com os animais não tratados (CT) que receberam somente salina, veículo utilizado na solubilização da fração butanólica (Fig. 10).

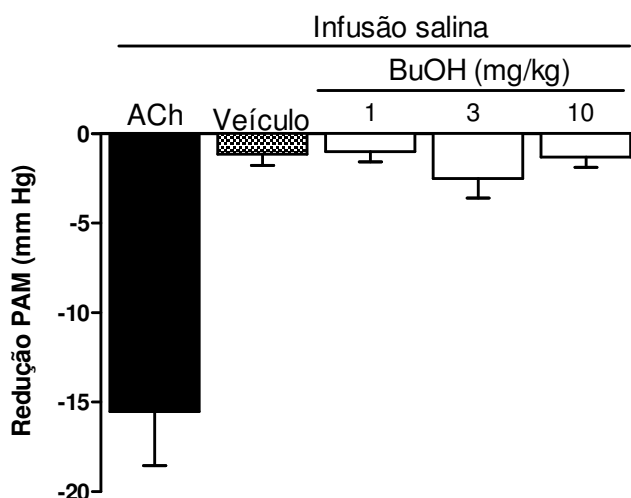


**Figura 10: Efeito hipotensor da fração BuOH das cascas de *S. buxifolia* em diferentes tempos após a administração aguda pela via oral.** Os dados mostram a PAM dos ratos não tratados (CT) e tratados com a fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* na dose de 10 mg/Kg (v.o.), em diferentes tempos após o tratamento (1,5, 3 e 6 horas). Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média \* indica um valor de  $p < 0.05$ , quando comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida de Bonferroni).

### 3.7 Efeito Hipotensor da fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* na pressão arterial média (PAM) em ratos infundidos com fenilefrina, L-NAME e fenilefrina + ODQ.

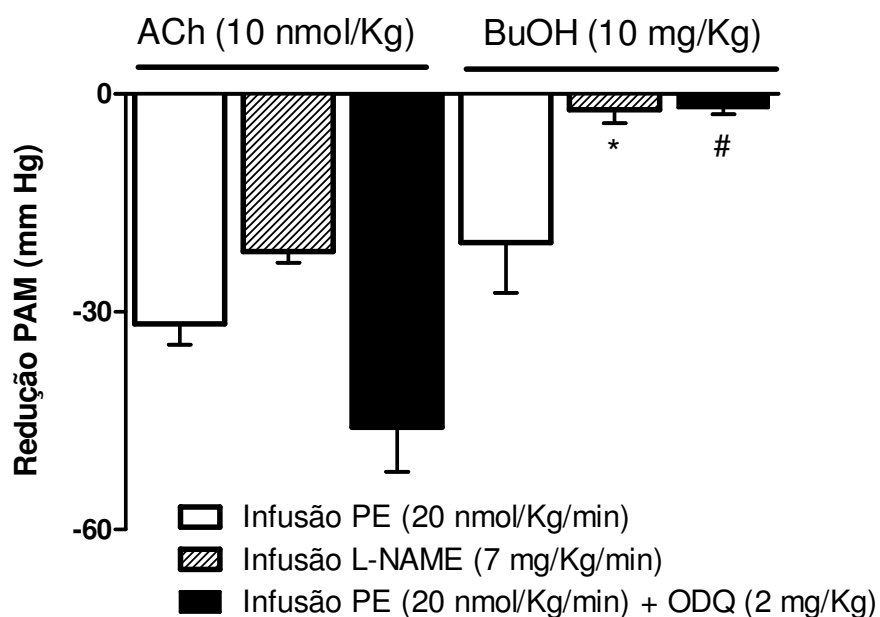
A administração intravenosa da fração BuOH da *S. buxifolia* em ratos normotensos anestesiados (animais infundidos somente com salina 9%, grupo controle) não promoveu redução dos níveis pressóricos, embora a administração de ACh (10 nmol/kg) tenha reduzido a PAM desses animais em  $15,5 \pm 3$  mm Hg (Fig. 11).

A infusão contínua com fenilefrina (agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico) induziu um aumento sustentado na PAM, que foi em média de 112 para 162 mm Hg. Nessas condições, a administração da fração BuOH na dose de 10 mg/kg (i.v.) reduziu a PAM em  $20,4 \pm 6,9$  mm Hg. Por sua vez, a administração aguda de ODQ (um inibidor seletivo da enzima guanilato ciclase solúvel; 2 mg/kg, i.v.) durante a infusão de fenilefrina aboliu o efeito hipotensor induzido pela fração butanólica da casca da *S. buxifolia*. Além disso, a administração intravenosa da fração BuOH (10 mg/kg) não reduziu a PAM de ratos infundidos com L-NAME (inibidor da enzima óxido nítrico sintase), apesar desse protocolo experimental resultar numa elevação sustentada da PAM de aproximadamente 20 mm Hg (Fig. 12)

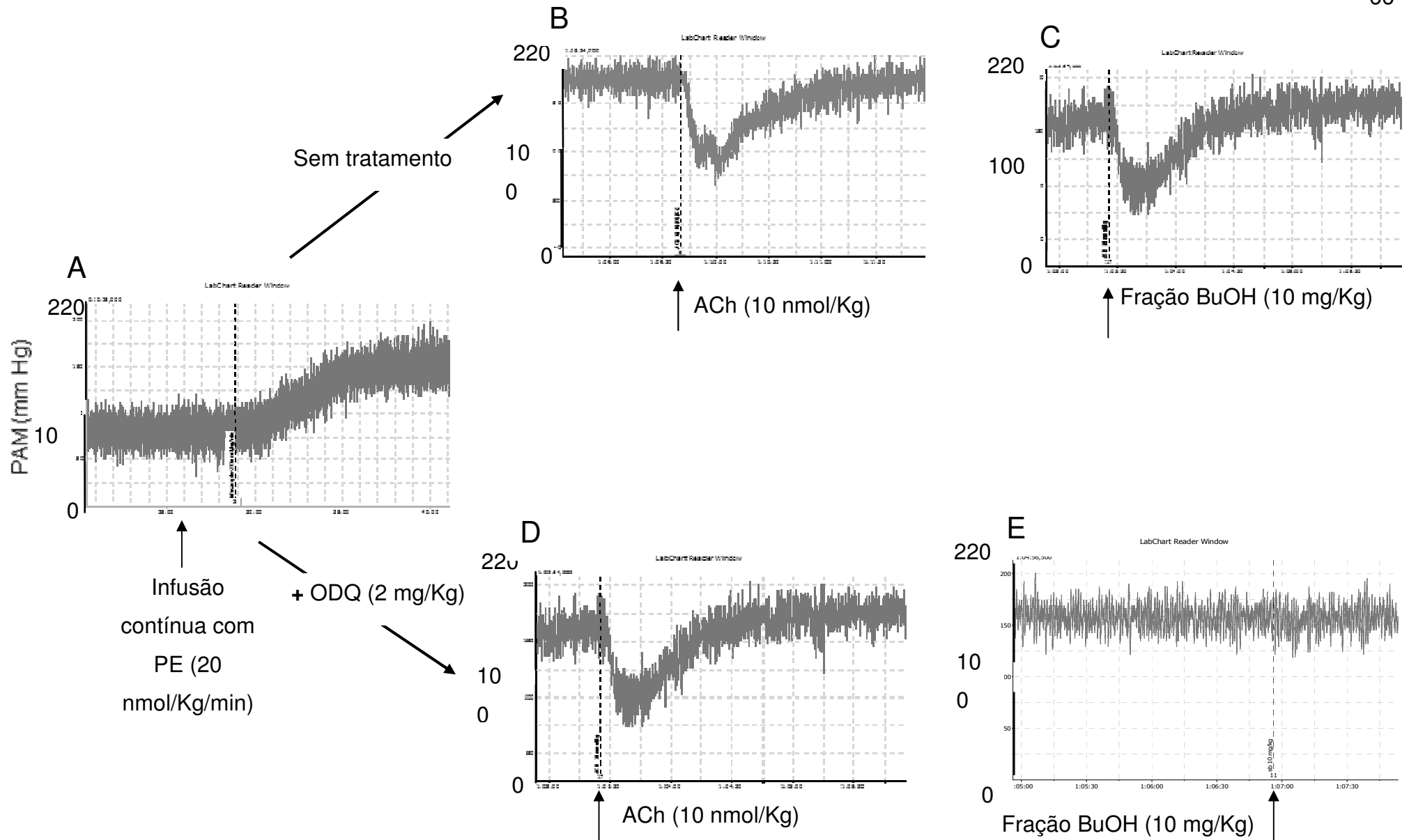


**Figura 11: Ausência de efeito hipotensor da fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* em ratos infundidos com salina.** Os resultados mostram a PAM dos ratos infundidos com salina, o efeito hipotensor promovido pela ACh e a ausência de redução da PAM no grupo tratado com a fração BuOH das cascas da *S. buxifolia*. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média. A análise estatística não mostrou diferenças entre os grupos (ANOVA de uma via seguida de Bonferroni).





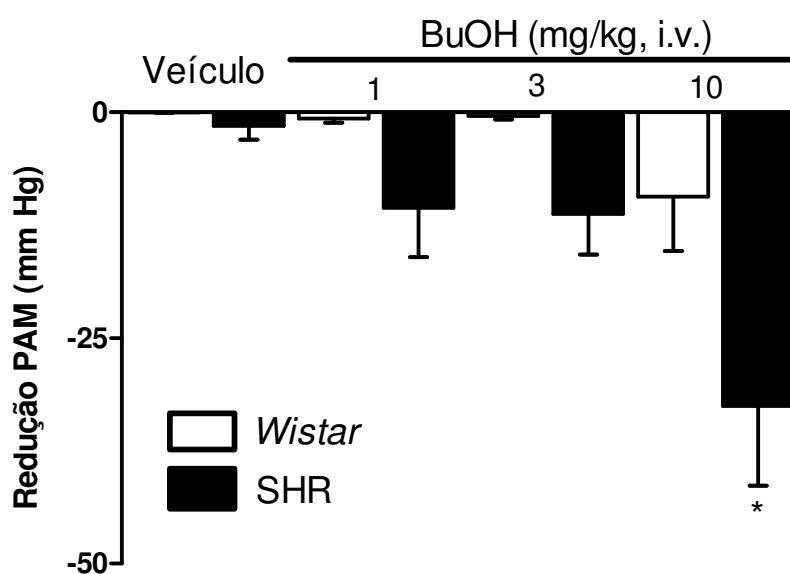
**Figura 12: Efeito hipotensor da fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* administrada pela via endovenosa em ratos *Wistar* anestesiados infundidos com fenilefrina ou L-NAME ou infundidos com fenilefrina e tratados agudamente com ODQ.** A fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* na dose da 10 mg/Kg, promoveu redução significativa da PAM em ratos infundidos com PE (fenilefrina), mas não em ratos infundidos com L-NAME, ou PE + ODQ. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média. \* indica  $p < 0,001$  e #  $p < 0,001$  quando comparado aos seus respectivos controles. (ANOVA de uma via, seguida de Bonferroni).



**Figura 13: Registro típico da PAM de ratos normotensos nos experimentos com infusão de fenilefrina.** O Painel A mostra a elevação da PAM após a infusão contínua com fenilefrina, enquanto os painéis B e C mostram a redução da PAM promovida pela acetilcolina (controle positivo) e pela fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* (10 mg/Kg), respectivamente. Os painéis D e E mostram a redução da PAM promovida pela ACh e ausência de efeito da fração BuOH em um animal infundido com PE mas tratado agudamente com ODQ.

### 3.8 Redução da PAM promovida pela fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* em ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

Em modelo experimental de ratos espontaneamente hipertensos, nos quais a hipertensão é de origem genética e semelhante à hipertensão essencial em humanos, a fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* quando administrada (i.v.) promoveu efeito hipotensor significativo e de maneira dose dependente, sendo a redução de  $32,5 \pm 8,8$  mm Hg na dose de 10 mg/Kg (Fig. 14).



**Figura 14: Efeito hipotensor da fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* em ratos SHR.** Os resultados mostram o efeito hipotensor da administração da fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* em ratos SHR e animais normotensos (Wistar), para fins de comparação. Os dados estão expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (ANOVA de uma via, seguida de Bonferroni), \*  $p < 0,05$ , quando comparado ao seu controle.

#### 4 DISCUSSÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma doença crônico-degenerativa, sendo uma das mais importantes causas de mortes prematuras em todo o mundo. Seu controle é um desafio para os profissionais da saúde (MOLINA *et al.*, 2003; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2006).

A HAS não apresenta sintomas, a menos que o paciente esteja em crise ou já apresente lesão em órgãos alvos específicos. Como o tratamento submete o paciente a mudanças em seus hábitos de vida, incluindo dietas restritivas, atividades físicas regulares e o uso de medicamentos diários que muitas vezes apresentam efeitos colaterais desagradáveis, muitos abandonam o tratamento (BORZECKI *et al.*, 2005). Dentro deste contexto a busca por novas drogas anti-hipertensivas que apresentem eficácia e segurança ainda é importante. O conhecimento e o uso popular de determinada planta pode guiar a farmacologia para conduzir estudos que possam comprovar a sua utilização.

Os compostos biológicos presentes nas plantas medicinais são fontes importantes para a pesquisa farmacológica e descobrimento de novas moléculas para o desenvolvimento de fármacos (JAYASURIYA, 1990). A espécie *Scutia buxifolia*, uma árvore que pertence à família Rhamnaceae, tem a casca de seu caule utilizada popularmente na forma de infusão em água como anti-hipertensiva e diurética (WASICKY *et al.*, 1964). Essa planta, entretanto, tem sido muito pouco estudada do ponto de vista de seus efeitos biológicos e farmacológicos. Já foi demonstrado que a espécie *S. buxifolia* apresenta alcalóides em suas raízes com atividade antimicrobiana (MOREL *et al.*, 2005), um efeito que não está relacionado às principais indicações populares dessa planta.

Análises fitoquímicas prévias dos extratos e frações da *S. buxifolia* revelaram a presença de metabólitos como: cumarinas, ácidos orgânicos, heterosídeos flavônicos, heterosídeos cianogênicos, fenóis e alcalóides. As frações acetato de etila (AcOEt) e butanólica (n-BuOH) apresentaram uma forte atividade antioxidante, efeito que pode estar relacionado à presença de polifenóis e de flavonóides em seus ramos. Alguns compostos como quercetina, isoquercitina e rutina já foram isolados desta planta, sendo a quercitrina o flavonóide encontrado em maior concentração (BOLIGON *et al.*, 2009). Alguns trabalhos evidenciaram que compostos polifenólicos como os flavonóides e ácidos orgânicos, obtidos de produtos naturais podem

apresentar efeito diurético e hipotensor (GASPAROTTO *et al.*, 2009). Já foi descrito que polifenóis como o resveratrol, encontrado no vinho, promove relaxamento vascular dependente da produção do NO e do EDHF (NDIAYE *et al.*, 2003; NDIAYE *et al.*, 2004; NDIAYE *et al.*, 2005). Também é relatado o aumento da síntese de prostaciclina e inibição da síntese de endotelina pelos compostos polifenólicos (OAK *et al.*, 2003). Os compostos polifenólicos podem agir indiretamente sobre o tônus dos vasos sanguíneos, por aumento da biodisponibilidade do NO. As propriedades antioxidantes atribuídas aos compostos polifenólicos, que neutralizam os ânions superóxido e outras espécies reativas de oxigênio, prolongam o efeito vasorrelaxante atribuído ao NO, promovendo assim um efeito cardioprotetor (STOCLET *et al.*, 2004; QUEEN & TOLLEFSBOL, 2010).

Apesar do uso popular da *Scutia buxifolia*, para o tratamento da hipertensão, sendo a mesma descrita como anti-hipertensiva e diurética, não encontramos relatos na literatura científica que possam validar ou não a utilização desta planta para tais fins. Essas atividades biológicas conferidas ao uso popular da *S. buxifolia* nos fez imaginar que possivelmente esses efeitos possam estar relacionados à presença dos compostos polifenólicos, principalmente os flavonóides em suas frações, pois além dos achados listados anteriormente, vários estudos demonstraram que compostos polifenólicos obtidos de produtos naturais podem apresentar atividade diuréticas e/ou hipotensoras (PECHANOVA *et al.*, 2006; WRIGHT *et al.*, 2007; YUNG *et al.*, 2008; JADHAV *et al.*, 2010). Por isso desenvolvemos estudos para analisar a possível atividade cardiovascular dos extratos brutos das cascas e das folhas e frações obtidas da *S. buxifolia*.

Em nosso trabalho verificamos que o extrato bruto das cascas e das folhas possui atividade vasorrelaxante em anéis de aorta com e sem endotélio funcional, previamente contraído por fenilefrina. Estes resultados preliminares nos levaram a investigar os efeitos vasculares das frações obtidas dos extratos bruto das cascas e das folhas de *S. buxifolia*. Todas as frações avaliadas apresentaram atividade vasorrelaxante em anéis de aorta isolada de rato, pré-contraídas por fenilefrina, tanto na presença quanto na ausência de endotélio funcional (Tabela 1). No entanto, a fração butanólica das cascas apresentou o maior relaxamento em menores concentrações ( $72,1 \pm 9$  e  $92,1 \pm 6,7\%$  para 10 e 30  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente) (Figura 2, Painel D). Baseado nesses resultados preliminares e no uso popular ser da infusão das cascas da *S. buxifolia*, optamos por utilizar a fração BuOH das cascas

para investigar o mecanismo de ação pelo qual ocorre o vasorrelaxamento na presença e na ausência de endotélio vascular.

Para avaliar o relaxamento dependente de endotélio investigamos a participação dos receptores muscarínicos, bradicininérgicos e histaminérgicos no efeito vasorrelaxante da fração BuOH. Para isso utilizamos a atropina (antagonista de receptores muscarínicos), o HOE-140 (antagonista de receptores  $B_2$  da bradicinina) e a pirilamina (antagonista de receptores  $H_1$  da histamina). A ativação desses e de outros receptores de membrana nas células endoteliais por substâncias endógenas como ACh, bradicinina, histamina, substância P e serotonina pode promover a produção e a liberação de mediadores endoteliais como NO, (FURCHGOTT, 1993; CHERRY *et al.*, 1982; VAN DE VOORDE & LEUSEN, 1982; COHEN *et al.*, 1983; GRIFFITH *et al.*, 1984), que atua sobre a camada muscular lisa e promove o relaxamento dos vasos. Em nossos experimentos, a presença dos antagonistas seletivos para esses receptores não modificou o relaxamento arterial promovido pela fração BuOH, descartando o envolvimento dos mesmos nesse efeito (Figura 3, Painéis A, B e C).

Já é bem estabelecido que o endotélio vascular, através da liberação de substâncias vasoativas, participa do controle do tônus vascular. Os mediadores endoteliais que induzem o vasorrelaxamento são a  $PGI_2$ , o NO e o EDHF (MONCADA & VANE, 1979; FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980; FELETOU & VANHOUTTE, 1988). Por isso investigamos a participação da  $PGI_2$  e do NO no relaxamento dependente de endotélio induzido pela fração BuOH. A prostaciclina ( $PGI_2$ ) atua localmente promovendo vasodilatação, e é o produto derivado do ácido araquidônico mais abundante no tecido vascular (MONCADA & VANE, 1979). A  $PGI_2$  é sintetizada a partir da ação da ciclooxigenase sobre o ácido araquidônico, dando origem ao  $PGG_2$ , o qual é reduzido a  $PGH_2$ , ainda pela ciclooxigenase (FERREIRA *et al.*, 1971). A enzima prostaciclina sintase converte o  $PGH_2$  a  $PGI_2$  (SMITH *et al.*, 1996) a qual, age localmente nas células do músculo liso promovendo vasorrelaxamento por atuar em receptores específicos  $IP$ , localizados na membrana das células do músculo liso vascular. A ativação desses receptores promove a ativação da enzima adenilato ciclase que aumenta a síntese do AMPc, o qual irá ativar a proteína quinase dependente de AMPc (PKA), que impede a interação da actina com a miosina, ocasionando o relaxamento vascular (HOPKINS & GORMAN, 1981; BENNETT, 1995). Para inibir a produção de  $PGI_2$  nos anéis de

aorta utilizamos a indometacina, uma droga anti-inflamatória não esteroide que inibe a enzima ciclooxigenase (FERREIRA *et al.*, 1971). Em nosso trabalho a exposição prévia dos anéis de aorta à indometacina não modificou o efeito vasorrelaxante promovido pela fração BuOH (Figura 4, painel B), sugerindo que a PGI<sub>2</sub> não é o mediador endotelial envolvido no efeito vasorrelaxante promovido pela fração BuOH.

Para o estudo do envolvimento do NO, mediador endotelial que participa do vasorrelaxamento através da ativação da enzima guanilato ciclase solúvel, utilizamos o L-NAME. Esta substância inibe a enzima óxido nítrico sintase. Além disso, utilizamos o inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel ODQ. O NO, sintetizado pelas células endoteliais por ação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) sobre o aminoácido L-arginina (BREDT *et al.*, 1991), difunde-se para o músculo liso vascular onde promove a ativação da enzima guanilato ciclase solúvel, que induz a conversão do nucleotídeo GTP em GMPc, (IGNARRO *et al.*, 1987a; IGNARRO *et al.*, 1987b), aumentando a sua concentração, o qual por sua vez ativa uma proteína quinase dependente de GMPc (PKG), que pode fosforilar e inibir outra quinase, a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK), reduzindo a fosforilação da miosina e consequentemente promovendo o relaxamento do músculo liso vascular (RAPOPORT *et al.*, 1983; RAPOPORT & MURAD, 1983). O relaxamento mediado pela enzima guanilato ciclase solúvel também pode decorrer da hiperpolarização gerada pela abertura de canais de potássio nas células do músculo liso vascular, também mediado pela PKG (ARCHER *et al.*, 1994).

Tanto a presença de L-NAME como de ODQ reduziu de forma significativa o efeito vasorrelaxante da fração BuOH em anéis de aorta com endotélio. Uma análise mais detalhada dos resultados apresentados na Figura 4 (Painel A) mostra que, na verdade, a inibição da NO sintase pelo L-NAME ou da guanilato ciclase solúvel pelo ODQ, impediu completamente a porção de relaxamento dependente do endotélio (~60%) promovido pela BuOH. Estes resultados mostram que a ativação da via óxido nítrico/guanilato ciclase é crucial para o relaxamento arterial dependente de endotélio gerado pela fração butanólica da casca da *S. buxifolia*.

Como mencionado no parágrafo anterior, uma segunda via de ação da PKG é através da fosforilação e abertura de canais de K<sup>+</sup>, o que ocasiona hiperpolarização e consequente relaxamento vascular (ARCHER *et al.*, 1994). O próprio NO (por ação direta; BOLOTINA *et al.*, 1997) e outros fatores liberados pelo endotélio também podem abrir diferentes subtipos de canais de potássio no músculo liso vascular

(WALDRON & COLE, 1999). A hiperpolarização causada pelo efluxo de íons  $K^+$  para o meio extracelular previne a abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem, reduzindo a entrada de cálcio para o meio intracelular, o que leva ao relaxamento vascular (NELSON & QUAYLE, 1995). Para investigar o envolvimento dos canais de  $K^+$  no relaxamento vascular promovido pela fração BuOH em preparações com e sem endotélio funcional utilizamos os seguintes bloqueadores de canais de  $K^+$ : o tetraetilamônio, bloqueador não seletivo de canais de  $K^+$ ; a glibenclamida, bloqueador seletivo de canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP; 4-aminopiridina, droga frequentemente utilizada como bloqueador seletivo de canais de  $K^+$  ativados por voltagem; e a iberiotoxina, bloqueador altamente seletivo para canais de  $K^+$  de alta condutância ativados por cálcio. A presença desses bloqueadores em anéis de aorta sem endotélio funcional reduziu significativamente o efeito vasorrelaxante da fração BuOH (Figura 7). Isto sugere que a abertura de canais de  $K^+$ , causada por mecanismos que permanecem por ser investigados, é responsável ao menos por parte do relaxamento vascular independente de endotélio causado pela fração BuOH da *S. buxifolia*.

A fenilefrina é um potente vasoconstritor que atua como agonista em receptores  $\alpha_1$ -adrenérgico presentes na membrana de células do músculo liso vascular. Ao se ligar nesses receptores ativa a fosfolipase C (PLC) e através da produção de IP<sub>3</sub> promove aumento na concentração intracelular de cálcio, induzindo a contração da musculatura lisa vascular (KARAKI *et al.*, 1997; WEBB, 2003). A incubação da fração BuOH não alterou a resposta contrátil induzida pela adição cumulativa de fenilefrina, sugerindo que o relaxamento vascular promovido pela fração provavelmente não é dependente da inibição desses receptores pela fração BuOH (Figura 6, Painel C). Da mesma forma, a incubação das concentrações de 10, 30 e 100  $\mu\text{g}/\text{m}$  da fração BuOH da casca da *S. buxifolia* também não reduziu o efeito contrátil induzido pela liberação de cálcio intracelular induzida pela adição de fenilefrina em aortas mantidas em líquido nutritivo livre de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 5, painel C), e tampouco alterou o efeito contrátil da adição cumulativa de  $\text{CaCl}_2$  em aortas mantidas em líquido livre de cálcio em condição despolarizante (Figura 5, Painel B). Estes resultados nos sugerem que o relaxamento vascular induzido pela fração BuOH em anéis de aorta desprovidos de endotélio funcional não envolve alterações na mobilização de cálcio intracelular ou qualquer evento que resulte na inibição da abertura de canais de cálcio de membrana, o que impediria a entrada de cálcio do



meio extracelular.

Para confirmar o efeito vasorrelaxante que observamos *in vitro* e ampliar o conhecimento sobre os possíveis efeitos diuréticos e hipotensores da fração BuOH (efeitos atribuídos à planta *S. buxifolia* pela medicina popular), avaliamos a atividade da fração em modelos de diurese e de medida direta da pressão arterial em ratos normotensos e SHR anestesiados.

Animais normotensos tratados com a fração BuOH das cascas tiveram aumento significativo no volume de excreção urinária na dose de 10 mg/Kg (Figura 8, Painéis A e B). Parâmetros como pH e densidade da urina não apresentaram diferenças entre os grupos. Muitos estudos mostram que produtos naturais podem apresentar simultaneamente a efeitos vasodilatadores, atividade diurética e hipotensora (PECHANOVA *et al.*, 2006; GASPAROTTO *et al.*, 2009). Nesse caso, os efeitos podem ocorrer como consequência do aumento do fluxo sanguíneo renal, ou em virtude da inibição da reabsorção tubular de água e eletrólitos (STANIC & SAMARZIJA, 1993; PANTOJA *et al.*, 1991). Baseado nos efeitos vasodilatadores encontrados em anéis de aorta e no papel exercido pelo óxido nítrico nesse efeito, é possível que a ação diurética da fração BuOH possa ser consequência do aumento do fluxo sanguíneo renal pela ação vasodilatadora promovida pelo NO, porém esta hipótese permanece por ser investigada.

Para avaliarmos o efeito hipotensor da fração BuOH das cascas da *S. buxifolia* os animais foram tratados em diferentes tempos com a fração BuOH na dose de 10 mg/Kg, a mesma que apresentou efeito diurético nos animais. A administração aguda da fração BuOH pela via oral promoveu redução significativa da pressão arterial média (PAM) dos animais, conforme mostrado na figura 9, sendo o pico do efeito hipotensor observado na 3ª hora após o tratamento. Curiosamente, a administração endovenosa da fração BuOH nas doses 1, 3 e 10 mg/kg em ratos normotensos não reduziu significativamente a PAM dos animais (Figura 11). Entretanto, em animais normotensos submetidos a uma infusão contínua de fenilefrina (20 nmol/Kg/min; protocolo este padronizado no nosso laboratório, CRESTANI *et al.*, 2009), procedimento capaz de gerar um estado hipertensivo agudo nos animais, a administração intravenosa de 10 mg/Kg da fração BuOH reduziu a PAM dos animais em cerca de 20 mm Hg (Figura 12). O tempo necessário para o retorno da PAM aos valores registrados depois da administração da fração BuOH foi relativamente curto (entre 2 e 5 minutos), demonstrando que o efeito

hipotensor gerado pela fração é reversível. Farmacologicamente, o retorno rápido da PAM aos valores basais é um dado importante, pois sugere que o alvo de ação das substâncias ativas não é inativado, que sua biotransformação ocorre rapidamente e, talvez mais importante, que não ocorre lesão tissular.

Os dados obtidos nos experimentos realizados *in vitro* com anéis de aorta revelaram a participação da via NO/guanilato ciclase no relaxamento vascular promovido pela fração BuOH. Como já foi descrito anteriormente, o NO participa de várias funções fisiológicas, principalmente da vasodilatação dependente de endotélio vascular. Para avaliar a participação do óxido nítrico e da guanilato ciclase solúvel no efeito hipotensor da fração BuOH *in vivo* utilizamos o L-NAME, inibidor da óxido nítrico sintase, e o ODQ, inibidor da guanilato ciclase solúvel. Apesar da infusão contínua de L-NAME elevar a PAM dos animais para valores semelhantes àqueles obtidos pela infusão de fenilefrina, a fração BuOH não causou qualquer alteração na PAM desses animais. Além disso, animais infundidos com fenilefrina (20 nmol/Kg/min), mas tratados com uma única dose de ODQ não apresentaram redução da PAM após a administração da fração butanólica (Figura 12). Esses resultados corroboram com os nossos achados *in vitro*, indicando que a via óxido nítrico/guanilato ciclase tem papel fundamental também na ação hipotensora promovida pela fração BuOH das cascas da *S. buxifolia in vivo*.

A busca por um modelo experimental que pudesse caracterizar uma patologia tão importante como a hipertensão essencial em humanos, e que tem como característica uma origem multifatorial, levou pesquisadores a desenvolverem modelos experimentais de hipertensão arterial (WIENSTOCK, 1994; PAGE, 1989). Dentre os vários modelos existentes encontra-se o modelo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), desenvolvido por Okamoto e Aoki (OKAMOTO & AOKI, 1963). Nos ratos SHR a hipertensão é de origem genética, sendo, entre os modelos de hipertensão existentes, um dos mais estudados devido à similaridade da sua fisiopatogenia com a hipertensão essencial (primária) dos seres humanos (FAZAN *et al.*, 2001). Os ratos SHR desenvolvem hipertensão espontânea entre a 7<sup>a</sup> e a 15<sup>a</sup> semanas, tanto os machos como as fêmeas. Nesses animais, a hipertensão está associada a um aumento da resistência periférica total e um débito cardíaco normal ou diminuído (YAMORI, 1984; POTTS *et al.*, 1998). Para verificar o efeito hipotensor da fração BuOH em modelo de hipertensão utilizamos animais SHR. Os resultados obtidos mostraram que a fração BuOH das cascas (1, 3 e 10 mg/Kg)

reduziu significativamente e de maneira dependente da dose a PAM dos animais SHR (Figura 14). Vale destacar que o efeito hipotensor observado nesses animais foi mais intenso do que aquele obtido em animais normotensos, mesmo aqueles submetidos à hipertensão aguda pela infusão de fenilefrina. Embora por razões não muito claras, sabe-se que inúmeros agentes anti-hipertensivos, inclusive dentre aqueles utilizados na clínica médica, apresentam efeitos hipotensores mais intensos em indivíduos hipertensos do que em pessoas normotensas.

Em conjunto, nossos resultados permitem sugerir que a fração BuOH, através de um mecanismo ainda não esclarecido mas que parece ser independente da ativação dos receptores muscarínicos, bradicininérgicos ou histaminérgicos, induz a produção e a liberação de NO pelas células endoteliais. O NO por mecanismo já descrito anteriormente promove o relaxamento vascular e consequentemente a redução da pressão arterial. Além disso, em condições experimentais nas quais os vasos ficam desprovidos de endotélio funcional, essa fração é capaz de causar um relaxamento significativo das artérias (embora muito menor do que o observado em preparações com endotélio íntegro), o qual decorre, ao menos em parte, em virtude da ativação dos canais de potássio no músculo liso vascular.

Os efeitos promovidos pela fração BuOH em preparações vasculares isoladas, na diurese e na pressão arterial de ratos, despontam como as primeiras evidências científicas que podem embasar e justificar a utilização da infusão das cascas da *S. buxifolia* pela medicina popular, como diurética e anti-hipertensiva. Apesar de essas evidências dependerem de estudos complementares, tanto em roedores como em outras espécies, nosso estudo sugere que a planta *Scutia buxifolia* possui potencial terapêutico para o tratamento de distúrbios cardiovasculares como, por exemplo, a hipertensão. Estudos complementares são necessários para confirmar qual o composto ou compostos biológicos são responsáveis por esses efeitos, qual o biomarcador que pode ser utilizado para otimização e padronização deste fito medicamento, quais as características farmacocinéticas do produto e, talvez mais importante, a segurança e/ou riscos de toxicidade que podem existir principalmente quando da utilização continuada do mesmo, uma vez que a hipertensão é uma doença crônica que, na maioria das vezes, requer tratamento por toda a vida.

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo nos permitem sugerir que:

- O extrato bruto das cascas e das folhas obtido da planta *Scutia buxifolia*, e suas respectivas frações, possuem componentes ativos capazes de promover relaxamento vascular de modo dependente e independente de endotélio funcional;
- A fração butanólica das cascas apresentou o maior efeito vasorrelaxante na presença de endotélio e relaxamento significativo na ausência de endotélio vascular;
- O relaxamento dependente de endotélio promovido pela fração não envolve a participação de prostanóides como a prostaciclina, nem a ação sobre receptores muscarínicos, bradikininérgicos ou histaminérgicos;
- O relaxamento dependente de endotélio envolve a produção de óxido nítrico, bem como a estimulação da enzima guanilato ciclase solúvel;
- O relaxamento independente de endotélio parece não envolver alterações na mobilização do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ou a entrada do  $\text{Ca}^{2+}$  do meio extracelular;
- A ativação dos canais de  $\text{K}^+$  está envolvida no relaxamento promovido pela fração na ausência de endotélio, principalmente os canais de  $\text{K}^+$  dependentes de voltagem e canais de  $\text{K}^+$  ativados por  $\text{Ca}^{2+}$  de alta condutância;
- A fração butanólica das cascas possui um ou mais componentes capazes de promover efeito diurético em ratos;
- O efeito hipotensor promovido pela fração butanólica em ratos normotensos infundidos com fenilefrina também parece depender da ativação do óxido nítrico e subsequente estimulação da guanilato ciclase solúvel;
- A administração intravenosa da fração butanólica da casca da *S. buxifolia* gera efeitos hipotensores dependentes da dose em animais espontaneamente hipertensos, um modelo de hipertensão frequentemente usado em estudos que buscam o desenvolvimento de novas terapias anti-hipertensivas.

## 6 REFERÊNCIAS

AJAY, M.; GILANI, A. U.; MUSTAFA, M. R. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. **Life Sci**, v. 74, n. 5, p. 603-612, 2003.

AJAY, M.; CHAI, H. J.; MUSTAFA, A. M.; GILANI, A. H.; MUSTAFA, M. R. Mechanisms of the anti-hypertensive effect of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces. **J of Etho**, Lausanne, v. 109, p. 388-393, 2007.

ARCHER, S.; HUANG, J. M.; HAMPL, V.; NELSON, D. P.; SHULTZ, P. J.; WEIER, E. K. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. **Proc Natl Acad Sci USA**, 91(16):7583-7587, 1994.

BASSENGE, E.; BUSSE, R.; POHL, U. Abluminal release and asymmetrical response of the rabbit arterial wall to endothelium-derived relaxing factor. **Circ Res**, 61(5 Pt 2): II68-73, 1987.

BEECH, D. J.; ZHANG, H.; NAKAO, K.; AND BOLTON, T. B. Single channel and whole-cell K-currents evoked by levcromakalim in smooth muscle cells from the rabbit portal vein. **Br J Pharmacol**. v.110: 583–590, 1993.

BENJUMEA, D.; ABDALA, S.; HERNANDEZ-LUIS, F.; PEREZ-PAZ, P.; MARTIN-HERRERA, D. Diuretic activity of *Artemisia thuscula*, an endemic Canary species. **J Ethno**, v.100, n. 1-2, p. 205-209, 2005.

BENNETT, W. Cyclic nucleotides and protein phosphorylation in vascular smooth muscle relaxation. **Kluwer Academic**, 3<sup>rd</sup> ed Boston: 975-998, 1995.

BHoola, K. D.; FIGUEROA, C. D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins; kallikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacol Rev**. 44(1): 1-80, 1992.

BOLIGON, A. A.; PEREIRA, R. P.; FELTRIN, A. C.; MACHADO, M. M.; JANOVIK, V.; ROCHA, J. B. T.; ATHAYDE, M. L. Antioxidant activities of flavonol derivatives

from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. **Bio Technol**, v. 100: p. 6592-6598, 2009.

BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P.J.; COHEN R. A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**. v.368: 850-853, 1994.

BORZECKI, A. M.; OLIVERIA, S. A.; BERLOWITZ, D. R. Barriers to hypertension control. **Am Heart J**. 149(5): 785-94, 2005.

BOO, Y. C.; JO, H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. **Am J Physiol Cell Physiol**. 285(3): 499-508, 2003.

BRAYDEN. J. E. Membrane hyperpolarization is a mechanism of endothelium-dependent cerebral vasodilation. **Am J Physiol**. 259:H668-673, 1990.

BREDT ,D. S.; HWANG,P. M.; GLATT, C. E.; LOWENSTEIN, C.; REED, R. R.; SNYDER, S. H. Cloned and expressed nitric oxide synthase production by cultured human endothelial cells by increasing arachidonic acid mobilization and conversion. **Arteriosclerosis**, 10(1): 129-134, 1991.

BREDT, D. S.; FERRIS, C. D. SNYDER, S. H. Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependet protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. **J of Biolo Chemi**. v. 267, n.16, p.10976-10981, 1992.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents).**Bra J and Bio Res**, 33, p. 179-189, 2000.

CAMPBELL, W. B.; GAUTHIER, K. M. What is new in endothelium-derived hyperpolarizing factors? **Curr Opin Nephrol Hypertens**. 11(2): 177-183, 2002.

CASTROP, H.; HOCHERL, K.; KURTZ, A.; SCHWEDA, V. T.; WAGNER C.

Physiology of kidney renin. **Physiol. Rev**, v. 90, n.2, p. 607-673, 2010. CESARINO, C. B.; CIPULLO, J. P.; MARTIN, J. F. V.; CIORLIA, L. A.; GODOY, M. R. P.; CORDEIRO, J. A.; RODRIGUES, I. C. Prevalência e fatores sócios demográficos em hipertensos de São José do Rio Preto. **Arq Bras Card**; 91(1): p.31–35, 2008.

CHERRY, P. D.; FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V.; JOTHIANANDAN, D. Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradikinin. **Proc Natl Acad Sci**, 79(6): 2106-2110, 1982.

CHOBANIAN, A. V.; BAKRIS, G. L.; BLACK, H. R.; CUSHMAN, W. C.; GREEN, L. A.; IZZO, JR, J. L. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. **JAMA**; 289:2560-72, 2003.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Discovery and Development of Antineoplastic Agents from Natural Sources. **Can Inves**, v.17, n. 2, p. 153-163, 1999.

CRESTANI, S.; RATTMANN, Y. D.; CIPRIANI, T. R.; DE SOUZA, L. M.; IACOMINI, M.; KASSUYA, C. A. L.; MARQUES, M. C. A.; DA SILVA-SANTOS, J. E. A potent and nitric oxide-dependent hypotensive effect induced in rats by semi-purified fractions from *Maytenus ilicifolia*. **Vas Pharmacol**, v.51: 57-63, 2009.

CODY, R. J.; ATLAS, S. A.; LARAGH, J. H.; KUBO, S. H.; COVIT, A. B.; RYMAN, K. S.; SHAKNOVICH, A.; PONDOLFINO, K.; CLARK, M.; CAMARGO, M. J. Atrial natriuretic factor in normal subjects and heart failure patients. Plasma levels and renal, hormonal and hemodynamic responses to peptide infusion. **J Clin Invest**, v.78(5): 1362-1374, 1986.

COHEN, R. A.; SHEPHERD, J. T.; VANHOUTTE, P. M. 5-Hydroxytryptamine can mediate endothelium-dependent relaxation of coronary arteries. **Am J Physiol**, v.245(6): H1077-H1080, 1983.

CORRIU, C.; FELETOU, M.; CANET, E.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived factors and hyperpolarization of the carotid artery of the guinea-pig. **Br J Pharmacol**,

v.119(5): 959-964, 1996.

DE BOLD, A. J.; BORENSTEIN, H. B.; VERESS, A. T.; SONNENBERG, H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. **Life Sci**, v.28 (1): 89-94, 1981.

DI STASI, L. C. **Plantas Medicinais : Arte e Ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: ed. UNESP, p.9-21, 1995.

DUKE, L. M.; EVANS, R. G.; WIDDOP, R. E. AT<sub>2</sub> receptors contribute to acute blood pressure-lowering and vasodilator effects of AT<sub>1</sub> receptor antagonism in conscious normotensive but not hypertensive rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.288(5):H2289-2297, 2005.

ELFERING, S. L.; SARKELA, T. M.; GIULIVI, C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. **J Biol Chem**, 277:38079–86, 2002.

ELLIS, E. F.; OELZ, O.; ROBERTS, L. J., 2<sup>ND</sup>; PAINE, N. A.; SWEETMAN, B. J.; NIES, A. S.; OATES, J. A. Coronary arterial smooth muscle contraction by a substance released from platelets: evidence that it is thromboxane A<sub>2</sub>. **Sci**, v.193(4258): 1135-1137, 1976.

EMURA, K.; YOKOMIZO, A.; TOYOSHI, T.; MORIWAKI, M. Effect of enzymatically modified isoquercitrin in spontaneously hypertensive rats. **J Nutr Sci Vitaminol**, v. 53, n. 1, p. 68-74, 2007.

ENDEMANN, D. H.; SCHIFFRIN, E. L. Endothelial dysfunction. **J Am Soc Nephrol**, v. 15, n. 8, p. 1983-1992, 2004.

ENKHMAA, B.; SHIWAKU, K.; KATSUBE, T.; KITAJIMA K.; ANUURAD, E.; YAMASAKI, M.; YAMANE, Y. Mulberry (*Morus alba* L.) leaves and their major flavonol quercetin 3-(6-malonylglucoside) attenuate atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. **J Nutr**, v. 135, n. 4, p. 729-34, 2005.



ESPERIDIÃO, S.; AJEJE, R.; KOPELMAN, B. I.; SIMÕES, M. J.; EVÊNCIO-NETO, J.; JÚNIOR, L. K. Chronic Effects of Acetylsalicylic Acid on Pregnant Rats. **Rev Bras de Gineco e Obs (RBGO)**, v.20, n.5, p.245-249, 1998.

FAZAN, JR. R.; SILVA, V. J. D.; SALGADO, H. C. Modelos de hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens**, v.8: 19-29, 2001.

FELETOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. **Br J Pharmacol**, v.93(3): 515-524, 1988.

FELETOU, M.; VANHOUTTE, P. M. EDHF: the complete story. Boca Raton, **Taylor & Francis CRC press**: v.1–298, 2006.

FELETOU, M.; VANHOUTTE, P. M. EDHF: an update. **Clinical Sci**, v.117, 139-155, 2009.

FELLOWS, L. E. Pharmaceuticals from traditional medical plants and other: Future prospects: In: J. D. Coombers, ed. **New drugs from natural sources**. London, IBC technical Services, 1992.

FERREIRA, S. H.; MONCADA, S.; VANE, J. R. Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from the spleen. **Nat New Biol**, v.231(25): 237-239, 1971.

FOGLIO, A. M.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. Divisão de Fitoquímica, CPQBA/UNICAMP, 2006.

FOZARD, J. R.; MANLEY, P. W. Potassium Channel Openers. **Prog Respir Res Basel**. v. 31. 77-80, 2001.

FRANGOS, J. A.; ESKIN, S. G.; MCINTURE, L. V.; IVES, C. L. Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. **Sci**, v. 227(4693): 1477-1479, 1985.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288: 5789, p. 373-376, 1980.

FURCHGOTT, R. F. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. **Circ Res**, v. 53, n.5, p. 557-573, 1983.

GARCIA-SAURA, M. F.; GALISTEO, M.; VILLAR, I. C.; BERMEJO, A.; ZARZUELO, A.; VARGAS, F. Effects of chronic quercetin treatment in experimental renovascular hypertension. **Mol Cell Biochem**, v. 270: 147-155, 2005.

GARTHWAITE, J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. **Eur J Neurosci**, 27: 2783–802, 2008.

GASPAROTTO, A.; BOFFO, M. A.; LOURENÇO, E. L.; STEFANELLO, M. E.; KASSUYA, C. A.; MARQUES, M. C. Natriuretic and Diuretic effects of *Tropaeolum majus* (Tropaeolaceae) in rats. **J Ethno**, v.122(3): 517-522, 2009.

GIANGIACOMO, K. M.; GARCIA, M. L.; MCMANUS, O. B. (1992). Mechanism of iberitoxin block of large conductance calcium-activated potassium channel from bovine aortic smooth muscle. **Biochemi**, v. 31: 6719–6727, 1992.

GRIFFITH, T. M.; EDWARDS, D. H.; LEWIS, M. J.; NEWBY, A. C.; HENDERSON, A. H. The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. **Nature**, v. 308(5960): 645-647, 1984.

GUYTON, A. C. Blood pressure control-special role of the kidneys and body fluids. **Sci**, v. 252(5014): 1813-1816, 1991.

HILGERS, R. H. P.; WEBB, R. C. Molecular Aspects of Arterial Smooth Muscle Contraction: Focus on Rho. Dept. of Physio. Medical College of Georgia, Augusta, Georgia 30912, 2005.

HOPKINS, N. K.; GORMAN, R. R. Regulation of endothelial cell cyclic nucleotide metabolism by prostacyclin. **J Clin Invest**, v. 67(2): 540-546, 1981.

HUTCHINSON, P.J.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Comparative pharmacology of EDRF and nitric oxide on vascular strips. **Eur J Pharmacol**, v. 141(3): 445-451, 1987.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. A importância das plantas medicinais: Princípios ativos de plantas superiores. Série de textos da Escola de Verão em Química- IV, São Carlos, SP, EdUFSCar, p.152 , 2003.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Nati Acad Sci (PNAS)**, v. 84, n.24, p.9265-9269, 1987a.

IGNARRO, L. J.; BYRNS, R. E.; BUGA, G. M.; WOOD, K. Mechanisms of endothelium-dependent vascular smooth muscle relaxation elicited by bradykinin and VIP. **Am J Physiol**, v.253(5 Pt 2): H1074-1082, 1987b.

JAYASURIYA, D. C. The regulation of medicinal plants - a preliminary review of selected aspects of national legislation, 1999.

JACOB, H. J. Physiological genetics: Application to hypertension research, **Cli Exp Phar Phy**, v.26, p.530-531, 1999.

KARAKI, H.; OZAKI, H.; HORI, M.; MITSUI-SAITO, M.; AMANO, K.; HARADA, K.; MIYAMOTO, S.; NAKAZAWA, H.; WON, K. J.; SATO, K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacol Rev**, v. 49(2): 157-230, 1997.

KAU, S. T.; KEDDI, J. R.; ANDREWS, D. A method for screening diuretic agents in the rats. **J Pharmacol Meth**, v.11: 67-75, 1984.

KO, E. A.; HAN, J.; JUNG, I. D.; PARK, W. S. Physiological roles of K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells, **J Smo Mus Res**. v.44(2): 65-81, 2008.

KNOT, H. J.; ZIMMERMANN, P. A.; NELSON, M. T. Extracellular K<sup>+</sup>-induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier K<sup>+</sup> channels. **J Physiol** (Lond.) v.492: 419–430, 1996.

KOEHN, F. E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nat Rev Drug Discov** v. 4, n. 3, p. 206-20, 2005.

KOROVKINA, V. P.; ENGLAND, S. K. Molecular diversity of vascular potassium channel isoforms. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. v.29: 317–323, 2002.

LAGANOVIC, M. Fixed combinations of antihypertensive medications-new opportunity in treatment of hypertension. **Lijec Vjesn**. v. 132, n. 3-4, p. 94-98, 2010.

LA MORENA, J. S.; DONAIRE, J. A. G.; URIOSTE, L. M. R. New therapeutic strategies to improve control of arterial hypertension and simplify the regimen of drug treatment. **Med Clin** (Barc); v.134 (14): 625-642, 2010.

LANGTON, P. D.; NELSON, M. T.; HUANG, Y.; STANDEN, N. B. Block of calcium-activated potassium channels in mammalian arterial myocytes by tetraethylammonium ions. **Am J Physiol**. v.260: H927–H934, 1991.

LEE, C. R., WATKINS, M. L., PATTERSON, J. H., GATTIS, W., O'CONNOR, C. M., GHEORGHIAD, M., ADAMS, K. F. JR. Vasopressin: A new target for the treatment of heart failure. **Ame Heart Journal**, v. 146, n.1, p. 9-18, 2003.

LESSA, I. Epidemiologia da insuficiência cardíaca e da hipertensão arterial sistêmica no Brasil. **Rev Bras de Hipertens**, v.8: 383–392, 2001.

LEWINGTON, S.; CLARKE, R.; QIZILBASH, N.; PETO, R.; COLLINS, R. for the Prospective Studies Collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. **Lancet**; v.360: 1903–1913, 2002.

LINCOLN, J.; BURNSTOCK, G. Neural-endothelial interactions in control of local

blood flow. In: *The Endothelium: An Introduction to Current Research*, J WARREN (ed), Wiley-Liss, New York, pp 21-31, 1990.

LOTUFO, P. A. Stroke in Brazil: a neglected disease. **São Paulo Medical Journal**, v. 123, n. 1, p. 3-4, 2005.

LUCKHOFF, A.; CLAPHAM, D. E. Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates an endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  permeable channel. **Nature**, v.355(6358): 356-358, 1992.

MALTA, D. C.; MOURA, L.; SOUZA, F. M.; ROCHA, F. M.; FERNANDES, F. M. Doenças crônicas não-transmissíveis: mortalidade e fatores de risco no Brasil, 1990 a 2006 in *Saúde Brasil*. Ministério da Saúde, Brasília. Pág 337–362, 2009.

MILLER, C.; MOCZYDLOWSKI, E.; LATORRE, R. & PHILLIPS, M. Charybdotoxin, a protein inhibitor of single  $\text{Ca}^{2+}$  -activated  $\text{K}^{+}$  channels from mammalian skeletal muscle. **Nature**, v. 313: 316–318, 1985.

MOLINA, M. del C.B.; CUNHA, R. de S.; HERKENHOFF, L. F.; MILL, J. G. Hipertensão Arterial e Consumo de Sal em População Urbana. *Rev de Saúde Pública*. São Paulo, v. 37, n.6, p. 743-749, 2003.

MONCADA, S.; GRYGLEWSKI, R.; BUNTING, S.; VANE, J.R. Na enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to na unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**, v.263(5579): 663-665, 1976.

MONCADA, S.; VANE, J. R. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane  $\text{A}_2$  and prostacyclin. **Pharmacol Rev**. v.30: 293-331,1979.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. **Biochem. Phamacol**. v. 38, n.11, p.1709-1715, 1989.

MOREL, F. A.; MALDANER, G.; ILHA, V.; MISSAU, F.; SILVA, F. U.; DALCOL, I.

Cyclopeptide alkaloids from *Scutia buxifolia* Reiss and their antimicrobial activity. **Phyto**, v. 66: 2571–2576, 2005.

MOTOYAMA, K.; Koyama, H.; MORIWAKI, M.; EMURA, K.; OKUYAMA, S.; SATO, E.; INOUE, M.; SHIOI, A.; NISHIZAWA, Y. Atheroprotective and plaque-stabilizing effects of enzymatically modified isoquercitrin in atherogenic apoE-deficient mice. **Nutri**, v. 25, n. 4, p. 421-427, 2009.

NAKAGAWA, O., TANAKA, I., USUI, T., HARADA, M., SASAKI, Y., ITOH, H., YOSHIMASA, T., NAMBA, T., NARUMIYA, S. AND NAKAO, K. Molecular cloning of human prostacyclin receptor cDNA and its gene expression in the cardiovascular system. **Circulation**, v.90: 1643-1647, 1994.

NELSON, M. T.; QUAYLE, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **Am J Physiol**. v.268: C799–C822, 1995.

NDIAYE, M. et al. Red wine polyphenols cause endothelium-dependent EDHF mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 310, n. 2, p. 371-377, 2003.

NDIAYE, M. et al. Red wine polyphenols induce EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries through the redox-sensitive activation of the PI3-kinase/Akt pathway. **Br J Pharmacol**, v. 142, n. 7, p. 1131-1136, 2004.

NDIAYE, M. et al. Red wine polyphenol-induced, endothelium-dependent NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated porcine coronary artery. **FASEB J**, v. 19, n. 3, p. 455-7, 2005

OAK, M. H. et al. Red wine polyphenolic compounds inhibit vascular endothelial growth factor expression in vascular smooth muscle cells by preventing the activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 23, n. 6, p. 1001-7, 2003.

OKABE, K.; KITAMURA, K.; KURIYAMA, H. Features of 4-aminopyridine sensitive outward current observed in single smooth muscle cells from the rabbit pulmonary artery. **Pflügers Arch.** v.409: 561-568, 1987.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jap Circ J.** v.27: 282-293, 1963.

OPIE, L. H. The Heart-Physiology, from cell to circulation. Philadelphia – New York, **Raven**, 1998.

PAGE, I. H. Theories concerning causes of hypertension. **Hyper Res:** a memoir 1920-1960. Pergamon Press, v.56-61, 1989.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v.327(6122): 524-526, 1987.

PANTOJA, C. V.; CHIANG, L.C.; NORRIS, B. C.; CONCHA, J. B. Diuretic, natriuretic and hypotensive effects produced by *Allium sativum* (garlic) in anaesthetized dogs. **J Ethno**, v. 31, n. 3, p. 325-331, 1991.

PARK, W. S.; SON, Y. K.; KIM, N. R.; YOUM, J. B.; JOO, H.; WARDA, M.; KO, J.H.; EARM, Y.E.; HAN, J. The protein kinase A inhibitor, H-89, directly inhibits KATP and Kir channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells. **Biochem Biophys Res Commun.** v.340: 1104-1110, 2006a.

PARK, W. S.; SON, Y.K.; KIM, N. R.; YOUM, J. B.; WARDA, M.; KO, J. H.; KO, E. A.; KANG, S. H.; KIM, E. Y.; EARM, Y. E.; HAN, J. Direct modulation of Ca<sup>2+</sup> activateK<sup>+</sup> current by H-89 in rabbit coronary arterial smooth muscle cells. **Vascul Pharmacol**, v. 46: 105–113, 2007a.

PARKINGTON, H. C.; TARE, M.; TONTA, M. A.; COLEMAN, H. A. Stretch revealed three components in the hyperpolarization of guinea-pig coronary artery in response

to accetylcoline. **J Physiol**, v.465: 459-476, 1993.

PEACH, M. J. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action **Physiol. Rev**, v.57(2): 313-370, 1997.

PECHANOVA, O.; REZZANI, R.; BABAL, P.; BERNATOVA, I.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Beneficial effects of Provinols: cardiovascular system and kidney. **Physiol Res**, v. 55 Suppl 1, p. S17-30, 2006.

PEREZ, V. F.; DUARTE, J. Flavonols: biochemistry behind cardiovascular effects. In: FRAGA, C. G. (Ed.). **Plant Phenolics and Human Helth**. New Jersey: John Wiley & Sons, p. 197-214, 2010.

PHILLIPS, O. A.; MATHEW, K. T.; ORIOWO, M. A. Antihypertensive and vasodilator effects of methanolic and aqueous extracts of *Tribulus terrestris* in rats. **J Ethno**. v. 104(3): 351-355, 2006.

PINTÉROVÁ, M.; LÍŠKOVÁ, S.; DOBEŠOVÁ, Z.; M. BEHULIAK, M.; KUNEŠ, J.; ZICHA, J. Impaired Control of L-Type Voltage-Dependent Calcium Channels in Experimental Hypertension. **Physiol. Res**. v.58 ( 2): S43-S54, 2009.

PLANE, F.; GARLAND, C. J. Influence of contractile agonists on the mechanism of endothelium-dependent relaxation in rat isolated mesenteric artery. **Br J Pharmacol**. v.119, 191-193, 1996.

POTTS, J. T.; MCKEOWN, K. P.; SHOUKS, A. A. Reduction in arterial compliance alters carotid barorreflexo control of cardiac output in a model of hypertension. **Am J Physiol**. v.43: 1121-1131, 1998.

QUAYLE, J. M.; BONEV, A. D.; BRAYDEN, J. E.; NELSON, M. T. Pharmacology of ATP-sensitive K<sup>+</sup> currents in smooth muscle cells from rabbit mesenteric arteries.



**Am. J. Physiol.** v.269: C1112–C1118, 1995.

QUAYLE, J. M.; DART, C.; STANDEN, N. B. The properties and distribution of inward rectifier potassium currents in pig coronary arterial smooth muscle. **J Physiol.** (Lond.) v.494: 715–726, 1996.

QUEEN, B. L.; TOLLEFSBOL, T. O. Polyphenols and aging. **Curr Aging Sci**, v. 3, n. 1, p. 34-42, 2010.

RAINFORTH, M V.; SCHNEIDER, R. H.; NIDICH, S. I.; GAYLORD-KING, C.; SALERNO, J. W.; ANDERSON, J. W. Stress reduction programs in patients with elevated blood pressure: a systematic review and meta-analysis. **Curr Hypertens Rep**, v. 9, 520-528, 2007.

RAPOPORT, R. M.; DRAZNIN, M. B.; MURAD, F. Endothelium-dependent vasodilator and nitrovasodilator-induced relaxation may be mediated through cyclic GMP formation and cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. **Trans Assoc Am Physicians**, v.96: 19-30, 1983.

RAPOPORT, R. M.; MURAD, F. Agonist-Induced Endothelium-Dependent Relaxation in Rat Thoracic Aorta May Be Mediated through cGMP. **J Am Heart Asso**, v.52: 352-357, 1983.

RATES, S. M. K. Plants as sources of drugs. **Toxicon**, Oxford v.39, p.603-613, 2001.

RICHARD, S. Vascular effects of calcium channel antagonists: new evidence. **Drugs** 26 ( 2): 1–10, 2005.

ROBERTSON, B.E.; SCHUBERT,R.; HESCHELER, J.; NELSON, M. T. cGMP-dependent protein kinase aactivates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. **Am J Physiol**, v.265(1 Pt 1): C299-303, 1993.

ROSS, R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. **N Engl J Med**, v.340: 115-126,

1999.

SBC/SBH. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. 2006

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVIK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L.A.; Petrovik, P. R. (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre/Forianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, Capítulo 15, p. 301-332, 2001.

SCHIFFRIN, E. L. A critical review of the role of endothelial factors in the pathogenesis of hypertension. **J Cardiovasc Pharmacol**. v.38(2): S3-6, 2001.

SMIRNOV, S. V.; AARONSON, P. I. Ca<sup>2+</sup>-activated and voltage-gated K<sup>+</sup> currents in smooth muscle cells isolated from human mesenteric arteries. **J Physiol**. (Lond.) v.457: 431–454, 1992.

SIMÕES, C. M. O. S. E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. Rio Grande do Sul, 2001.

SMITH, W. L.; GARAVITO, R. M.; DEWITT, D. T. Prostaglandin endoperoxide H synthases ( cyclooxygenases)-1 and-2. **J Biol Chem**, v.271(52): 33157-33160, 1996.

SOBEY, C. G. Potassium channel function in vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc Biol*. v.21: 28–38, 2001.

SOBRAL, M.; JARENKOW, J.A.; BRACK, P.; IRGANG, B.; LAROCCA, J. & RODRIGUES, R.S. Flora arbórea e arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil. São Carlos, RiMA/Novo Ambiente, 2006.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arq Bras Cardiol*: 1–48, 2006.

SOUZA NETO, E. P.; NEIDECKER, J.; LEHOT, J. J. [To understand blood pressure and heart rate variability]. **Ann Fr Anesth Reanim**, v. 22(5): 425-452, 2003.

STANDEN, N. B.; QUAYLE, J. M. K<sup>+</sup> channel modulation in arterial smooth muscle. **Acta Physiol Scand**, v.164: 549–557, 1998.

STANIC, G.; SAMARZIJA, I. Diuretic activity of *Satureja montana* subsp. *Montana* extracts and oil in rats **Phytother Res**, v. 7, n. 5, p. 363-366, 1993. STONE, J. R.; MARLETTA, M. A. Heme stoichiometry of heterodimeric soluble guanylate cyclase. **Biochem**, v.34(45): 14668-14674, 1995.

STANDEN, N. B.; QUAYLE, J. M. K<sup>+</sup> channel modulation in arterial smooth muscle. **Acta Physiol Scand**, v. 164: 549–557, 1998.

STOCLET, J. C. et al. Vascular protection by dietary polyphenols. **Eur J Pharmacol**, v. 500, n. 1-3, p. 299-313, 2004.

STREB, H.; IRVINE, R. F.; BERRIDGE, M. J.; SCHULZ, I. Release of Ca<sup>2+</sup> from a non mitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,2,5-trisphosphate. **Nature**, v. 306: 67–69, 1983.

TANIGUCHI, J.; FURUKAWA, K. I.; SHIGEKAWA, M. Maxi K<sup>+</sup> channel are stimulated by cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in canine coronary artery smooth muscle cells. **Pfugers Arch**, v. 423: 167-172, 1993.

TARE, M.; PARKINGTON, H. C.; COLEMAN, H. A.; NEILD, T. O.; DUSTING, G. J. Hyperpolarization and relaxation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide from the endothelium. **Nature**, v. 346: 69-71, 1990.

TÖRÖK, J. Participation of Nitric Oxide in Different Models of Experimental Hypertension. **Physiol Res**, v. 57: 813-825, 2008.

TYKOCKI, N. R.; WATTS, S. W. The interdependence of endothelin-1 and calcium: a review. **Clinical Science**, v.19: 361–372, 2010.

UEMASU, J.; MATSUMOTO, H.; KITANO, M.; KAWASAKI, H. Suppression of plasma endothelin-1 level by alpha-human atrial natriuretic peptide and angiotensin converting enzyme inhibition in normal men. **Life Sci**, v.53(11): 969-974, 1993.

VAN DE VOORDE, J.; LEUSEN, I. Vascular endothelium and the relaxation effect of histamine on aorta of the rat. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v.256(2): 329-330, 1982.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 38: 97-120, 1998.

VELTMAR, A.; GOHLKE, O.; UNGER, T. From tissue angiotensin converting enzyme inhibition to antihypertensive effect. **Am J Hypertenses**, v.4(3 Pt 2): 263S-269S, 1991.

VERBALIS, J.G. Disorders of body water homeostasis. Best Practice & research Clinical Endocrinology & Metabolism, v 17, p.471-503, 2003.

VITOR, R. F.; MOTA-FILIPPE, H.; TEIXEIRA, G.; BORGES, C.; RODRIGUES, A. I.; TEIXEIRA, A.; PAULO, A. Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury. **J Ethno**, v. 93, n. 2-3, p. 363-70, 2004.

WALDRON, G. J.; COLE, W. C. Activation of vascular smooth muscle K<sup>+</sup> channels by endothelium-derived relaxing factors. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 26: 180–184, 1999.

WASICKY, R.; WASICKY, M.; JOACHIMOVITS, R. Erstuntersuchungen na Coronilha – *Scutia buxifolia* Reissek. **Planta Med.** 12, p:13–25, 1964.

WEBB, R. C. SMOOTH MUSCLE CONTRACTION AND RELAXATION, *Advances in Physiology Education*, vol. 27: 4, 2003.

WEINSTOCK, M. Neurogenic hypertension. *Handbook of hypertension*. Elsevier **Science**, 1994.

WEINHEIMER, G.; WAGNER, B.; OSSWALD, H. Interference of phorbol esters with endothelium-dependent vascular smooth muscle relaxation, **Eur J Pharmacol**, v.130(3): 319-322, 1986.

WHO. Pharmacy-Based Hypertension Management Model: Protocol and Guidelines. A Joint CINDI/EuroPharm Forum project, 2005.

WIEMER, G.; SCHOLKENS, B. A.; LINZ, W. Endothelial protection by converting enzyme inhibitors. **Cardiovasc Res**, v.28(2): 166-172, 1994.

WILLIAMS B. The year in hypertension. **JACC**; 55(1): 66-73, 2010.

WILLIAMS, D.L., JR.; KATS, G. M. "Guanosine 5'- monophosphate modulates gating of high-conductance  $Ca^{2+}$  -activated  $K^{+}$  channels in vascular smooth muscle cells". **Proc Natl Acad Sci**, v.85(23): 9360-9364, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity. Preventing and managing the global epidemic. WHO/NUT/NCD 98.1. Geneva, jun 1997.

YAMORI, Y. Development of the spontaneously hypertensive rat (SHR) and of various spontaneous rat models, and their implications. **Handbook of hypertension**. 224-239, 1984.

YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.; MITSUI, Y.; YAZAKI, Y.; GOTO, K.; MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cell. **Nature**, v.332(6163): 411-415, 1988.

XU, X.; AND LEE, K. S. Characterization of the ATP-inhibited K<sup>+</sup> current in canine coronary smooth muscle cells. **Pflügers Arch**, v. 427: 110–120, 1994.

## ANEXO A

Foram coletadas cascas (651,52g) e folhas (372,34g) da *S. buxifolia*. O material vegetal coletado foi seco ao ar livre, moído e triturado. O extrato bruto das folhas e das cascas do tronco foram obtidos através da maceração hidroalcóolica (EtOH:H<sub>2</sub>O 7:3, v/v) do material que foi colocado em recipiente fechado e recoberto com o solvente. Todos os macerados foram submetidos a agitações manuais diárias, por um período de sete dias. Ao fim deste período os conteúdos foram filtrados, seguindo-se de concentração em evaporador rotatório, em temperatura inferior à 40 °C para a eliminação do etanol, obtendo-se assim os extratos bruto hidroalcóolicos das folhas (rendimento – 10,59) e das cascas (rendimento – 10,97%). Para a obtenção das frações o extrato bruto foi particionado através da extração sequencial utilizando solventes de polaridade crescente: diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) (DCM), acetato de etila (AcOEt) e n-butanol (BuOH). Com rendimento das cascas de: DCM - 1,53%; AcOEt - 6,03% e BuOH - 7,32%, das folhas: DCM– 0,70%; AcOEt– 5,42% e BuOH– 7,24%.